

Mechanismen der hepatischen Immunregulation

DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katja Gärtner
aus
Freudenstadt

Bonn 2011

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle
Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 15.09.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum von Februar 2008 bis Juni 2011 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe.

Bonn, den 09.06.2011

Meiner Familie

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteile folgender Publikation und Kongressbeiträge:

Veröffentlichung:

“A novel CTL effector function mediated by TNF and XIAP”

▲D. Stabenow, ▲K. Gärtner, M. Odenthal, J. M. Seeger, S. Hegenbarth, C. Börner, B. Arnold, G. Hämmerling, B. Niesswandt, M. John von Freyend, N. van Rooijen, H. Ehlken, A. Limmer, K. Cederbrant, M. Pasparakis, U. Protzer, H-P. Dienes, H. Kashkar, C. Kurts, M. Krönke and P. A. Knolle

(▲ contributed equally)

Zur Publikation eingereicht

Kongressbeiträge:

- | | |
|------|--|
| 2009 | <p>Vortrag auf dem „ 2nd European Congress of Immunology“ der EFIS in Berlin.</p> <p>Titel: “CD8 T cell mediated immune response against cross-presenting liver sinusoidal endothelial cells leads to hepatitis“</p> |
| 2010 | <p>Vortrag auf der 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Leipzig.</p> <p>Titel: „Cross-presenting liver endothelial cells facilitate MHC-I-unrestricted CTL effector function in viral hepatitis“</p>
<p>Posterpräsentation auf der „Monothematic Conference of the European Association for the study of the liver (EASL)“ in Amsterdam.</p> <p>Titel: „Endothelial cell cross-presentation initiates TNFa-dependent CD8 T cell immunity against virus-infected hepatocytes“</p> |
| 2011 | <p>Posterpräsentation auf der 27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) in Regensburg.</p> <p>Titel: „A novel non-MHC-I-restricted CTL effector function mediated by TNF and XIAP“</p> |

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT	II
I. EINLEITUNG	1
1. Die Leber als immunregulatorisches Organ und als Zielorgan von Immunantworten	1
1.1 Mikroarchitektur der Leber.....	1
1.2 Mechanismen der viralen Immunregulation am Beispiel hepatotroper Viren	4
2. Die Antivirale Immunität	5
2.1 Erkennung viraler Strukturen über „Pattern Recognition Receptors“ (PRR)	5
2.2 Die Bedeutung der Kreuzpräsentation in der viralen Immunität	5
2.3 Die Effektorfunktionen zytotoxischer T Zellen	7
3. Mechanismen der Regulation von Apoptose.....	8
3.1 Apoptose.....	8
3.2 Der Tumor Nekrose Faktor (TNF).....	11
3.3 IAP (<i>engl.</i> inhibitor of apoptosis protein).....	12
II. FRAGESTELLUNG	14
III. MATERIAL UND METHODEN	15
1. Material	15
1.1 Geräte	15
1.2 Verbrauchsmaterialien	16
1.3 Chemikalien und Reagenzien	17
1.4 Allgemeine Lösungen	19
1.4.1 Medien	19
1.4.2 Puffer	19
1.5 Antikörper	22
1.5.1 Antikörper für Durchflusszytometrie und ELISA.....	22
1.5.2 Western Blot Antikörper	23
1.6 Magnetische Kügelchen (MACS-Beads)	23
1.7 Enzyme	23
1.8 PRR-Liganden	24
1.9 Inhibitoren	24
1.10 Viren.....	24
1.11 Zelllinien.....	25

1.12	Mauslinien	25
2.	Methoden	27
2.1	Zellisolation	27
2.1.1	Aufreinigung von LSEC aus der Leber	27
2.1.2	Die Isolation von Kupffer Zellen aus der Leber	27
2.1.3	Hepatozytenisolation	28
2.1.4	Isolation von Lymphozyten aus der Leber	28
2.1.5	Die Isolation und Aktivierung von OT-I T Zellen aus Milz und Lymphknoten	29
2.2	ROS Bestimmung mittels H ₂ DCFDA Färbung	29
2.3	Western Blot	30
2.4	Durchflusszytometrie	32
2.4.1	Markierung von Oberflächenantigenen	32
2.4.2	Intrazelluläre Färbung von Antigenen	33
2.5	ELISA	33
2.5.1	„Sandwich“-ELISA	33
2.5.2	Bead Assay	34
2.6	Leberhistologie	34
2.6.1	TUNEL-Färbung	34
2.6.2	Elektronenmikroskopie	35
2.7	Adenovirenproduktion	35
2.8	<i>In vivo</i> Biolumineszenz	37
2.9	Generierung von Knochenmarkschimären	37
2.10	Statistische Analysen	38
IV.	ERGEBNISSE	39
1.	Charakterisierung transgener Mäuse mit zelltyp-spezifischer Expression des MHC Klasse I-Moleküls H-2K ^b	39
2.	Etablierung eines <i>in vivo</i> Modells für virale Hepatitis	40
3.	Adenoviren infizieren bevorzugt die Leber, wobei nur Hepatozyten und keine LSEC infiziert werden	41
4.	Kreuzpräsentation viraler Antigene durch LSEC	43
5.	Konsequenzen der Kreuzpräsentation viraler Antigene für die Entwicklung einer Hepatitis	44
5.1	Makrophagen und Dendritische Zellen spielen keine Rolle für die Hepatitisinduktion ..	47
5.2	Die Kreuzpräsentation von LSEC vermittelt antivirale Immunität	48

6. Die Thrombozytenakkumulation beeinflusst nicht die virale Entstehung einer viralen Hepatitis.....	49
7. TNF von zytotoxischen T Zellen führt bei Infektion zu einer Hepatitis	51
8. Die virale Infektion ist Voraussetzung für den TNF- vermittelten Tod von Hepatozyten	53
9. Das Ausmaß der Hepatitis ist abhängig von der Virusmenge	56
10. Hepatozyten sind das primäre Ziel von TNF	57
11. TNF führt in infizierten Hepatozyten zur Apoptose	58
12. ROS ist an der TNF–vermittelten viralen Hepatitis beteiligt.....	60
13. Die Reduktion der XIAP-Expression ermöglicht in infizierten Hepatozyten die TNF-vermittelte Apoptose.....	62
V. DISKUSSION	64
1. Die Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Hepatitis-Induktion	65
2. Kreuzpräsentation von LSEC vermittelt antivirale Immunität.....	66
3. TNF aus zytotoxischen T Zellen vermittelt virale Hepatitis	67
4. Die virale Infektion macht Hepatozyten für TNF sensitiv	68
5. Die infizierten Hepatozyten sterben durch TNF–vermittelte ROS und Caspase-abhängige Apoptose.....	69
6. XIAP kontrolliert die TNF-vermittelte Apoptose-Induktion in infizierten Hepatozyten	70
VI. LITERATURVERZEICHNIS	74
VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
VIII. ABKÜRZUNGEN	86

Zusammenfassung

Die Leber vermittelt als immunmodulatorisches Organ einerseits eine periphere Immun-Toleranz, muss aber andererseits bei einer Infektion gleichzeitig die Induktion einer Immunantwort zulassen, die in der Lage ist, infizierte Zielzellen zu eliminieren. LSEC (*engl.* liver sinusoidal endothelial cells) endozytieren lösliche Antigene aus dem Blut und induzieren durch Kreuzpräsentation dieser Antigene auf MHC Klasse I Molekülen in naiven CD8 T Zellen eine antigen-spezifische periphere Immun-Toleranz. Bislang war es nicht bekannt, ob LSEC auch zirkulierende CD8 T Zellen, die bereits in sekundär lymphatischen Organen zu zytotoxischen T Zellen gereift sind, im Rahmen einer viralen Infektion aktivieren und so zur antiviralen CD8 T Zell-Immunität und Immunüberwachung in der Leber beitragen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LSEC virales Antigen von infizierten Hepatozyten an CD8 T Zellen kreuzpräsentieren. Die Kreuzpräsentation viraler Antigene durch LSEC ist ausreichend, um eine zytotoxische T Zell-vermittelte virale Hepatitis auszulösen, auch in Abwesenheit einer direkten Antigenpräsentation infizierter Hepatozyten. Die zytotoxischen T Zellen, stimuliert durch die Kreuzpräsentation der LSEC, produzieren TNF, welches in infizierten Hepatozyten eine Caspase und ROS- (*engl.* reactive oxygen species) abhängige Apoptose auslöst. Die Regulation der Apoptose in virus-infizierten Hepatozyten erfolgt durch Steuerung des Expressionslevel von XIAP (*engl.* x-linked inhibitor of apoptosis protein). Die virale Infektion in Hepatozyten führt zur Reduktion der XIAP-Expression und sensitiviert so die Hepatozyten für die TNF-vermittelte Apoptose. Somit konnte in dieser Arbeit ein neuer Effektormechanismus von zytotoxischen T Zellen beschrieben werden. Dieser nicht-kanonische Effektormechanismus kommt ohne die direkte MHC I-Erkennung der Zielzelle durch zytotoxische T Zellen aus und wird durch die verminderte XIAP-Expression infizierter Hepatozyten ermöglicht, die zu einer selektiv gesteigerten Sensitivität gegenüber TNF-vermittelter Apoptose führt.

Abstract

The liver is an immunomodulatory organ that on the one hand mediates peripheral tolerance, but on the other hand must induce immun responses that are able to kill the infected cells. LSEC (liver sinusoidal endothelial cells) endocytose soluble antigens from blood, cross-present these antigens on MHC I-molecules to naive CD8 T cells and induce peripheral tolerance in these T cells. So far it was not known whether LSEC are able to activate circulating T cells that were already primed in secondary lymphoid organs and contribute to antiviral immunity and immune surveillance during a viral infection in the liver. Here it could be demonstrated that LSEC are able to cross-present hepatocyte derived viral antigens to cytotoxic CD8 T cells. This cross-presentation of hepatocyte derived viral antigens by LSECs to cytotoxic T cells was sufficient to trigger viral hepatitis even in the complete absence of direct antigen-presentation on infected hepatocytes. TNF released from cytotoxic T cells after antigen-recognition on LSEC leads to caspase and ROS- (reactive oxygen species) dependent apoptosis induction in infected hepatocytes. Apoptosis is regulated by altering the expression levels of XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis protein). Viral infection leads to down-regulation of XIAP and sensitizes hepatocytes for TNF-induced apoptosis. Therefore, a new cytotoxic T cell effector function was identified in this work. This non-canonical effector mechanism works without direct MHC I-recognition of the target cells by cytotoxic T cells through down-regulation of XIAP expression in infected hepatocytes. This increases the sensitivity towards TNF-mediated apoptosis induction.

I. Einleitung

1. Die Leber als immunregulatorisches Organ und als Zielorgan von Immunantworten

Die Leber erfüllt neben den Funktionen als zentrales Stoffwechsel- und Entgiftungs-Organ auch wichtige immunologische Aufgaben. Das Blut, welches die Leber durchströmt, stammt zu ca. 80% aus der Portalvene, die das Blut aus dem Gastrointestinaltrakt sammelt. Entsprechend beinhaltet dieses Blut eine Vielzahl an harmlosen Nahrungsmittelantigenen, gegen die immunologische Toleranz entwickelt werden muss. Auf der anderen Seite müssen Pathogene, die bevorzugt die Leber infizieren, als fremd erkannt werden, damit sich eine Immunantwort bilden kann.

1.1 Mikroarchitektur der Leber

Die Leber besteht aus einer Vielzahl von Zellpopulationen, die für die Struktur und die Funktionen der Leber wichtig sind. Dazu gehören die sinusoidalen Endothelzellen (LSEC), Hepatozyten, Kupffer Zellen, Ito Zellen, Dendritische Zellen und hepatische Lymphozyten (Abb. I.1).

Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) repräsentieren eine besondere Art der Endothelzellen, die perfekt an die speziellen Anforderungen in der Leber angepasst sind. Sie kleiden die Sinusoide der Leber aus und bilden so eine riesige Oberfläche, durch die ca. 2000 Liter Blut täglich fließt. Der Blutstrom ist durch den geringen Durchmesser der Sinusoide von ca. 5-7 μm stark verlangsamt, welcher einen intensiven Stoffaustausch von Blut und Leber gewährleistet. Dieser wird auch durch die Tatsache begünstigt, dass LSEC sogenannte Fenestrae und keine Basalmembran besitzen. Fenestrae sind kleine Löcher in den LSEC von 100nm Durchmesser, die für eine direkte Verbindung zwischen dem Blut und dem sogenannten Disse-Raum sorgen, der den Zwischenraum von LSEC und Hepatozyten darstellt. Antigene und Makromoleküle können neben diesem direkten Transport auch mittels Rezeptoren, wie dem Mannose-Rezeptor, so genannten „Scavenger“-Rezeptoren, L-SIGN und Fc-Rezeptoren aus dem Blut aufgenommen werden. So tragen die LSEC zu einer Reinigung des Blutes von gealterten Zellen, Antigenen und bakteriellen Abbauprodukten bei (Smedsrod, 2004). Sie sind zusammen mit Makrophagen Teil des sogenannten Retikulo-Endothelialen Systems. Die aufgenommenen (Makro-)Moleküle

werden entweder durch Transzytose an die Hepatozyten weitergegeben oder werden mittels MHC I und MHC II auf den LSEC selbst präsentiert (Knolle und Limmer, 2003). Bedingt durch den engen Durchmesser der Sinusoide haben zirkulierende T Zellen engen Kontakt mit den Endothelzellen. Durch die Expression von MHC I und MHC II sind LSEC in der Lage, Antigen an CD4 T Zellen als auch an CD8 T Zellen zu präsentieren. Werden die Antigene auf MHC II präsentiert können LSEC naive CD4 T Zellen stimulieren, was zur Induktion eines regulatorischen Phänotyps führt, die IL-10 und IL-4 produzieren (Katz et al., 2005; Knolle et al., 1999). Werden die löslichen Antigene von LSEC aus der Zirkulation aufgenommen und mittels Kreuzpräsentation auf MHC I an CD8 T Zellen präsentiert, führt dies zur Induktion von Toleranz, da diese T Zellen keine zytotoxische Aktivität besitzen und nach Restimulation kein IL-2 und IFN γ produzieren (Limmer et al., 2000; Diehl et al., 2008). Wenn jedoch LSEC mit dem murinen Cytomegalie-Virus (MCMV) infiziert werden, führt dies nicht zur Toleranz-Induktion sondern zur Reifung der CD8 T Zellen in Effektor T Zellen (Kern et al., 2010). So tragen LSEC, in ihrer Rolle als APC, zur Regulation von Immunantworten in der Leber bei.

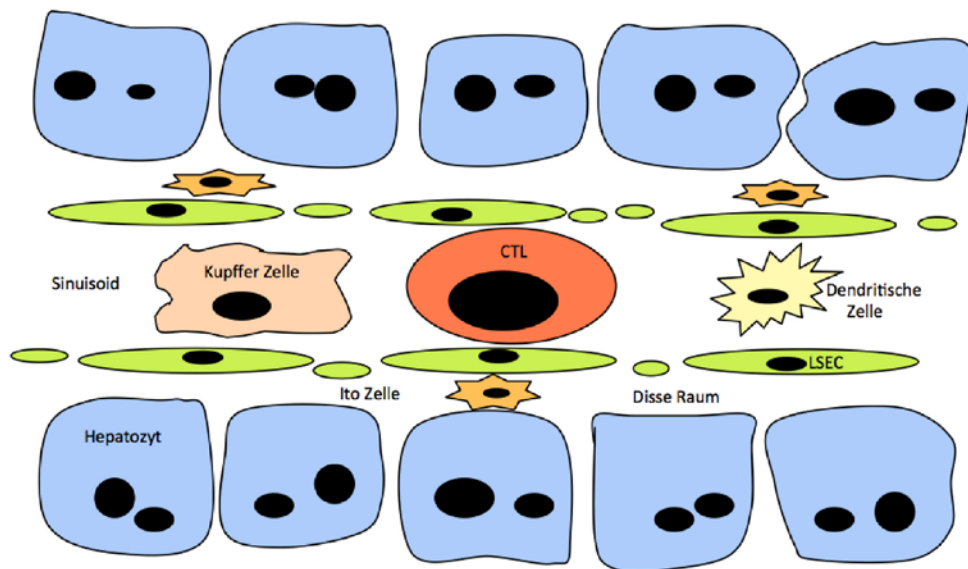


Abb. I.1 Die Zellpopulationen der Leber

Mit einem Anteil von ca. 60% machen die Hepatozyten den größten Anteil an Zellen in der Leber aus. Da sie durch eine Schicht Endothelzellen vom Blutstrom getrennt sind, wird ein direkter Kontakt von zirkulierenden Lymphozyten mit Hepatozyten erschwert. Jedoch wurde gezeigt, dass T Zellen durch die Fenestrae einen direkten Kontakt zu Hepatozyten aufnehmen können (Warren et al., 2006). Unter Normalbedingungen

exprimieren Hepatozyten nur im geringen Maße MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Es wurde nachgewiesen, dass dies ausreicht um naive CD8 T Zellen zu aktivieren (Bertolino et al., 1998). Jedoch sterben diese CD8 T Zellen, nach einer initialen klonalen Expansion, durch Bim- und Caspase-abhängige Apoptose ab (Holz et al., 2008).

In den Sinusoiden der Leber finden sich CD8⁻ myeloide, als auch CD8⁺ lymphoide Dendritische Zellen (O'Connell et al., 2000). Dabei liegt der Gesamtanteil Dendritischer Zellen in der Leber 2-5 fach höher, als in anderen Organen, wie dem Herzen oder der Niere (Steptoe et al., 2000). Wenn man jedoch den Anteil an MHC II positiven Dendritischen Zellen betrachte, befindet sich die Leber an letzter Stelle (Steptoe et al., 2000). Die Dendritischen Zellen der Leber nehmen im Sinusoid Antigene auf, um sie dann an T Zellen präsentieren zu können (Sumpter et al., 2007).

Kupffer Zellen der Leber bilden die größte Population residenter Makrophagen im gesamten Körper. Sie halten sich meist in den Sinusoiden auf, wo sie direkten Kontakt zum Blut und darin zirkulierenden Lymphozyten bekommen und so ihre Aufgabe als phagozytierende Zelle wahrnehmen können. Neben Pathogenen beseitigen die Kupffer Zellen auch Endotoxine, Immunkomplexe, apoptotische oder entartete Zellen und andere Mikropartikel aus dem Blut (Bertolino, 2002). In ihrer Rolle als APC können sie exogenes Antigen aufnehmen und an CD8 T Zellen kreuzpräsentieren (Klein et al., 2007). Durch die Stimulation von TLR-4 schütten die Kupffer Zellen pro-inflammatorische Moleküle, wie TNF, IL-1 β und „reactive oxygen species“ (ROS) aus. LPS, was unter normalen Umständen in physiologischen Konzentrationen aus dem Magen in die Leber gelangt, führt jedoch zur Expression von IL-10 in Kupffer Zellen (Knolle et al., 1995). So kann IL-10 durch die Reduktion der Antigenaufnahme, der MHC II-Expression und der Expression von kostimulatorischen Molekülen, die LSEC und Kupffer Zell-vermittelte Aktivierung von CD4 T Zellen unterdrücken (Knolle et al., 1998).

Im sogenannten Disse Raum, der sich zwischen den LSEC und den Hepatozyten befindet, sind die Ito-Zellen lokalisiert (Blouin et al., 1977; Geerts 2001). Sind diese Zellen nicht aktiviert stellen sie den größten Speicher für Vitamin A dar. Bei Aktivierung können sie in Myofibroblasten differenzieren und extrazelluläre Matrix produzieren, welche die Vernarbung bei einer Leberzirrhose verursacht (Kanta et al., 2002). Außerdem können Ito-Zellen mit T Zellen interagieren und diese aktivieren (Winau et al., 2007).

1.2 Mechanismen der viralen Immunregulation am Beispiel hepatotroper Viren

Es gibt eine Vielzahl an Viren, die die Leber infizieren können. Unter ihnen nehmen Hepatitis B und C eine besondere Stellung ein, weil diese persistente Infektionen, Leberzirrhose und auch Leberkrebs auslösen können. Hepatitis B Viren (HBV) und Hepatitis C Viren (HCV) sind nicht zytopathische Viren, das heißt, das Virus vermehrt sich ohne dabei die Zelle zu töten. Der genaue Mechanismus, wie Hepatozyten infiziert werden, ist noch weitestgehend ungeklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass LSEC HBV aufnehmen können und gerichtet zu Hepatozyten transportieren und es so zur Infektion von Hepatozyten kommt (Breiner et al., 2001). Außerdem können LSEC über die Expression von L-SIGN HCV einfangen (Gardner et al., 2003) und so zu einer Infektion von Hepatozyten beitragen. Werden Viren von infizierten Zellen erkannt wird normalerweise die Produktion von $\text{IFN}\alpha/\beta$ stimuliert, was eine Vielzahl antiviraler Mechanismen aktiviert (Samuel, 2001). Das HBV bleibt jedoch in der frühen Phase der Infektion erst einmal unentdeckt, bis einige Wochen später eine adaptive Immunantwort in Gang gesetzt wird (Wieland et al., 2004), denn HBV kann die Expression von $\text{IFN}\beta$ unterdrücken (Twu et al., 1988). Eine HCV Infektion führt zwar zur $\text{IFN}\alpha/\beta$ -Induktion, jedoch können virale Proteine diese Induktion beeinflussen und so die antiviralen Mechanismen unterbinden (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999). Deshalb ist die Aktivierung der adaptiven Immunantwort von großer Bedeutung für die Elimination von HBV und HCV. Dabei spielen zytotoxisch T Zellen eine zentrale Rolle (Ando et al., 1994). Es wurde gezeigt, dass ein adoptiver Transfer einer HBV spezifischen zytotoxischen T Zellen-Linie oder Klone in immunologisch tolerante HBV-transgene Mäuse ein pathologisches Bild liefert, das der akuten viralen Hepatitis im Menschen sehr nahe kommt (Ando et al., 1994; Guidotti et al., 1996). Auch die Ausschüttung von Zytokinen kann direkt oder indirekt zur Entstehung einer viralen Hepatitis beitragen. Dabei spielt TNF eine zentrale Rolle, denn die TNF-Produktion ist in den meisten inflammatorischen Lebererkrankungen erhöht (Tilg und Diehl, 2000). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass TNF-Rezeptor „knock out“ Mäuse in verschiedenen Modellen einen geringeren Leberschaden zeigten und die Hepatitis bei Behandlung mit einem TNF-Antikörper geringer ist (Tsukamoto und Lu, 2001). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass TNF und $\text{IFN}\gamma$ bei einer viralen Hepatitis zur Viruselimination von HBV beitragen, ohne die infizierten Zellen zu töten (Guidotti et al., 1996).

2. Die Antivirale Immunität

Wenn der Organismus von einem Virus oder einem anderen Pathogen infiziert wird, hält das angeborene (innate) Immunsystem die ersten Abwehrmechanismen bereit, um die Infektion an der Ausbreitung im Körper zu hindern. Das erworbene (adaptive) Immunsystem wird erst später, nach einer Reifungsphase, aktiv. Dabei entwickelt das adaptive Immunsystem sehr spezifische und effiziente Mechanismen zur Eliminierung der Pathogene und bildet zudem ein immunologisches Gedächtnis aus.

2.1 Erkennung viraler Strukturen über „Pattern Recognition Receptors“ (PRR)

Damit der Körper eine virale Infektion bekämpfen kann, muss er die viralen Strukturen als fremd erkennen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), die hoch konservierte Strukturen von Pathogenen („Pathogen-Associated Molecular Patterns“ PAMP) erkennen können (Janeway und Medzhithov, 2002). Bei den PAMPs handelt es sich bei Viren z.B. um virale RNA oder DNA, bei Bakterien sind dies z.B. Strukturen der Zellwand wie das Lipopolysaccharid (LPS). Die am besten untersuchten PRR sind die „Toll like“-Rezeptoren (TLR), die an der Zelloberfläche als auch intrazellulär lokalisiert sind. Durch die Stimulation der TLR mit PAMPs werden Signalwege in Gang gesetzt, die antimikrobielle Effektorfunktionen aktivieren und Inflammation hervorrufen (Medzhithov, 2001). Die Stimulation der TLRs auf den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Dendritische Zellen, spielen dabei eine wichtige Rolle für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Nach Stimulation werden auf den APC kostimulatorische Moleküle exprimiert, die für die Aktivierung von naiven T Zellen wichtig sind.

2.2 Die Bedeutung der Kreuzpräsentation in der viralen Immunität

T Zellen lassen sich aufgrund ihrer Oberflächenexpression in CD4 positive und CD8 positive T Zellen einteilen. CD4 T Zellen werden auch Helfer T Zellen genannt, weil sie anderen Immunzellen, wie z.B. B Zellen oder CD8 T Zellen, durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Sekretion von Zytokinen, dabei helfen eine effektive Immunität aufzubauen. CD8 T Zellen können zu zytotoxischen T Zellen reifen und mit ihren Effektorfunktionen effektiv zur Viruselimination beitragen. Hatten T Zellen aber noch keinen Kontakt mit dem jeweiligen Antigen, besitzen sie noch keine Effektorfunktion

und werden als naive T Zelle bezeichnet. Um Effektorfunktionen ausüben zu können, müssen sie in Kontakt mit dem jeweiligen Antigen kommen. Dieser Kontakt findet meist nicht im infizierten Organ selbst statt, sondern in den sekundären lymphatischen Organen, in die die professionellen antigenpräsentierenden Zellen wandern, wenn sie ihr Antigen am Ort der Infektion aufgenommen haben. Dort präsentieren sie das Antigen an die naiven T Zellen. Diese Stimulation führt zur klonalen Expansion der T Zelle und zur Reifung zu einer Effektorzelle, die dann im Zielorgan in der Lage ist, die infizierten Zellen zu eliminieren. CD4 und CD8 T Zellen unterscheiden sich dabei in der Art, wie ihnen das Antigen präsentiert werden muss. CD4 T Zellen können ihr Antigen nur erkennen, wenn ihnen professionelle APC das Antigen über den MHC II-Komplex präsentieren. Antigene stammen dabei von außerhalb der Zelle. Die Pathogene werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen, prozessiert und über den MHC II-Komplex an der Zelloberfläche exprimiert. CD8 T Zellen können im Gegensatz dazu ihr Antigen nur erkennen, wenn es ihnen über den MHC I-Komplex präsentiert wird. Die Antigene stammen bei dieser Art der Präsentation aus der Zelle selbst. Es handelt sich dabei um körpereigene Antigene und intrazelluläre Pathogene, wie Viren. Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel und Biosynthesemechanismen besitzen, können sie sich deshalb auch nur in einer Zelle vermehren. Sind die Viren einmal in der Zelle angekommen, sind sie z.B. für eine Antikörpererkennung nicht mehr erreichbar. Deshalb spielen CD8 T Zellen für die Elimination virusinfizierter Zellen eine entscheidende Rolle.

Die Präsentation von exogen aufgenommenem Antigen erfolgt wie bereits erwähnt über den MHC II-Komplex. Somit könnten nur CD4 T Zellen auf diese Art und Weise zu Effektor T Zellen aktiviert werden. CD8 T Zellen könnten nur dann zur Effektorzelle reifen, wenn die Dendritischen Zellen direkt mit dem Virus infiziert sind und so eine Antigenpräsentation über den MHC I-Komplex ermöglicht wird. Nicht alle Viren können auch Dendritische Zellen infizieren und kommt es doch zur Infektion kann dies zu gestörten Funktion der Dendritischen Zellen führen (Salio et al., 1999; Gabrilovich et al., 1994; Engelmayer et al., 1999). Deshalb gibt es APCs, vor allem die CD8 positiven Dendritischen Zellen, die in der Lage sind, exogen aufgenommenes Antigen über den MHC I-Komplex zu präsentieren (Carbone und Bevan, 1990; Kurts et al., 1996). Diese Art der Präsentation wird Kreuzpräsentation genannt. Daraus resultiert, dass CD8 T Zellen für ihre Reifung zur Effektorzelle auf die Kreuzpräsentation angewiesen sind. Schon 1976 prägte Bevan den Begriff „cross-priming“ für diese Art der CD8 T Zell Reifung (Bevan et al., 1976). Das „cross-priming“ ist außerdem bei Virusinfektionen wichtig, die zwar Dendritische Zellen infizieren, aber sich der Präsentation über den

MHC I Weg entziehen können, wie das murine Cytomegalie-Virus (MCMV) (Kurts et al., 2010).

Sind nun die naiven T Zellen durch die Kreuzpräsentation der Dendritischen Zellen zur Effektorzelle gereift können sich diese vom lymphatischen Organ zum Ort der Infektion begeben und die virusinfizierten Zellen eliminieren. Es ist dabei aber noch weitgehend ungeklärt, ob die Kreuzpräsentation auch eine Rolle während der Effektorphase im Zielorgan spielt.

2.3 Die Effektorfunktionen zytotoxischer T Zellen

Zytotoxische CD8 T Zellen können virusinfizierte Zellen hauptsächlich durch drei Wege eliminieren. 2 davon benötigen direkten Zell-Zell Kontakt zwischen der Effektor- und der Ziel-Zelle. Dabei handelt es sich um die Perforin/Granzym-vermittelte zytolytische Elimination der virusinfizierten Zelle und den Weg über die Fas-vermittelte Aktivierung der Apoptose. Der dritte Weg wird über Zytokine vermittelt, die aber auch nur dann produziert und sekretiert werden, so lange die Stimulation über den T Zell Rezeptor besteht (Andersen et al., 2006).

Zu den zytolytischen Effektorfunktionen der zytotoxischen T Zellen, gehört die Perforin/Granzym-vermittelte Eliminierung der Zielzelle. Diese wird nur bei direktem T Zell Rezeptor/MHC I-Kontakt aktiviert (Henkart, 1997). Die zytotoxischen Proteine Perforin und Granzym B werden in den interzellulären Raum ausgeschüttet und von der Zielzelle aufgenommen, was zur Tötung der Zelle durch einen Caspase-abhängigen oder -unabhängigen Signalweg vermittelt wird (Trapani und Smyth, 2002). Es gibt aber auch Zellpopulationen, wie z.B. die Hepatozyten, die relativ resistent gegen die Perforin/Granzym vermittelte Eliminierung sind (Guicciardi und Gores, 2004).

Der zweite Weg wird über den direkten Kontakt der zytotoxischen T Zelle, die den Fas-Liganden exprimiert, mit der Zielzelle, die den Fas-Rezeptor auf ihrer Oberfläche trägt, vermittelt. Hierdurch wird in der Zielzelle die klassische Caspase-Kaskade und somit die Apoptose ausgelöst (Nagata, 1996). Zytokine wie TNF und $\text{IFN}\gamma$, vermitteln einen dritten Effektormechanismus der zytotoxischen T Zellen. TNF kann auf der Zielzelle an den TNF-Rezeptor binden und so direkt die Apoptose auslösen (Andersen et al., 2006). $\text{IFN}\gamma$ ist in der Lage, transkriptionell die MHC I-Präsentation und Fas zu aktivieren und kann so zu einer vermehrten MHC I-Präsentation und Fas-vermittelter Apoptose beitragen (Andersen et al., 2006). Da gezeigt wurde, dass bei einer viralen Hepatitis die Viruselimination in Mäusen die kein Fas und TNFR1 besitzen, stark

verspätet einsetzt, wird angenommen, dass diese Effektormechanismen eine zentrale Rolle spielen (Abougergi et al., 2005).

3. Mechanismen der Regulation von Apoptose

3.1 Apoptose

Alle Säugetierzellen besitzen ein Programm, welches ihnen ermöglicht, sich unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen in einer höchst kontrollierten Art und Weise selbst zu töten. Der Begriff Apoptose wurde 1972 durch die Veröffentlichung von Kerr, Wyllie und Currie geprägt. Die Apoptose wurde hier als eine besondere Form des Zelltods beschrieben, die durch bestimmte morphologische Veränderungen der Zelle, wie das Schrumpfen des Zytoplasmas, nukleäre Chromatinkondensation und die Fragmentierung des Zellkerns gekennzeichnet ist. Die Membran bleibt bei diesem Vorgang intakt bis die sterbende Zelle schnell von Gewebemakrophagen aufgenommen wird. So dringen keine Zellbestandteile nach außen. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellen anschwellen und platzen und so ihre Zellbestandteile auf die umliegenden Zellen verteilen, was eine unerwünschte Immunantwort zur Folge hat (Raff, 1998). Die morphologischen Veränderungen, die Kerr et al. 1972 beschrieben hat, werden durch verschiedene Proteasen verursacht (Hengartner, 2000). Ihr Aktives Zentrum trägt ein Cystein und sie spalten vor einem Aspartat im Substratprotein und werden deshalb Caspase genannt (Almenri et al., 1996). Sie werden als inaktive Procaspasen gebildet, die selbst durch Spaltung an einem Aspartat, meist durch eine andere Caspase oder Autokatalyse aktiviert werden (Nicholson und Thornberry, 1997). Während der Apoptose aktivieren sich die Caspasen gegenseitig in einer amplifizierenden Kaskade (Raff, 1998). So können die Caspasen andere spezifische Proteine schneiden, die dabei helfen die Zelle schnell und sauber zu eliminieren (Nicholson und Thornberry, 1997). Caspasen gelten als die Hauptakteure in der Ausführung der Apoptose. Wenn sie inhibiert werden wird die Apoptose verlangsamt oder sogar komplett gehemmt (Earnshaw et al., 1999).

Die Aktivierung der Caspase-Kaskade kann durch zwei Wege unterschieden werden. Der extrinsische Weg, der über Todesrezeptoren aktiviert wird und der intrinsische Weg, der über intrazelluläre Signale eingeleitet wird.

Der extrinsische Apoptoseweg wird über die Bindung eines Todesliganden an einen transmembranen Todesrezeptors der TNF-Superfamilie aktiviert. Zur TNF-Rezeptor-

Superfamilie gehören z.B. TNFR1, CD95 (Fas/APO1), TRAIL-R1/R2, DR3/6. Die Todesliganden sind TNF, CD95-L (FasL, APO-1L), TRAIL, APO3L, TWEAK. Die transmembranen Todesrezeptoren besitzen im intrazellulären Teil eine Todesdomäne („death domain“ DD), welche die Bindung signaltransduzierender Adaptermoleküle ermöglicht (Medema et al., 1997). FADD (*engl.* Fas associated death domain) ist dabei ein Adapterprotein im TNFR1, TRAIL und Fas-Signalweg bzw. RIP1 (*engl.* receptor interacting protein 1) noch zusätzlich im TNFR1-Signalweg (Daniel et al., 2001). Im Falle der TRAIL-Rezeptoren und des Fas-Rezeptors bindet FADD direkt an die DD des Rezeptors, im Falle von TNF ist hierzu noch die Bindung des Adaptermoleküls TRADD (*engl.* TNF-receptor associated DD) nötig (Chen und Goeddel., 2002; Hsu et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). FADD bindet dann direkt oder über TRADD an die Pro-Caspase-8 mittels DED (*engl.* death effector domain) und bildet am Rezeptor einen Komplex, der DISC genannt (*engl.* death inducing signaling complex) wird (Thorburn, 2003). Die Rekrutierung von Caspase-8 durch FADD führt zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8 (Salvesen und Dixit, 1999). Hier können je nach Zelltyp zwei verschiedene Signalwege unterschieden werden (Scaffidi et al., 1998). Bei der Signalübertragung der Typ 1 Zellen ist die Bildung des DISC-Komplex und die Menge an aktiver Caspase-8 stark erhöht (Scaffidi et al., 1998). So kann die aktive Caspase-8 dann direkt die Effektorcaspasen-3/6 und -7 aktivieren. In Typ 2 Zellen ist die Anzahl an DISC-Komplexen und somit auch an aktiver Caspas-8 erniedrigt. In diesem Falle benötigt die Weiterleitung eine Amplifikation des Signals. Dies geschieht durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid in tBid, was zur tBid-vermittelten Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt (Korsmeyer et al., 2000; Kuwana et al., 2002). Das freigewordene Cytochrom c bildet nun zusammen mit Apaf-1 (*engl.* apoptotic protease activating factor 1) und der Caspase-9 das sogenannte Apoptosom, ein hochmolekularer Komplex, der die Caspase-9 Aktivierung ermöglicht (Zou et al., 1999; Li et al., 1997). Das Apoptosom rekrutiert nun die Procaspase-3, die durch die aktive Caspase-9 gespalten und aktiviert wird und so die Apoptose vermittelt (Zimmermann und Green, 2001). Zusätzlich wird Smac/Diablo DIABLO (*engl.* second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) frei, welches an XIAP (*engl.* x-linked inhibitor of apoptosis protein) bindet und so die Inhibition von Caspase-9 und -3 beendet, was dann wiederum zur vollständigen Aktivierung von Caspase-3 und -9 führt (Li et al., 2002; Du et al., 2000).

Im Gegensatz zum Fas- und dem TRAIL-R-Signalweg, kommt es beim TNFR1 nach der Ligandenbindung zur Bildung von zwei Komplexen (Wilson et al., 2009), (Abb. I.2). Komplex 1 wird an der Plasmamembran gebildet und besteht aus TNFR1, TRADD, TRAF2 (*engl.* TNFR-associated factor 2), RIP1, cIAP1 (*engl.* cellular inhibitor of

apoptosis) und cIAP2 (Duprez et al., 2009). Die Komponenten dieses Komplexes sind wichtig für die NF κ B-Aktivierung. Durch Endozytose des TNFR1 bildet sich der Komplex 2, welcher dem DISC-Komplex analog ist (Micheau und Tschopp, 2003; Duprez et al., 2009).

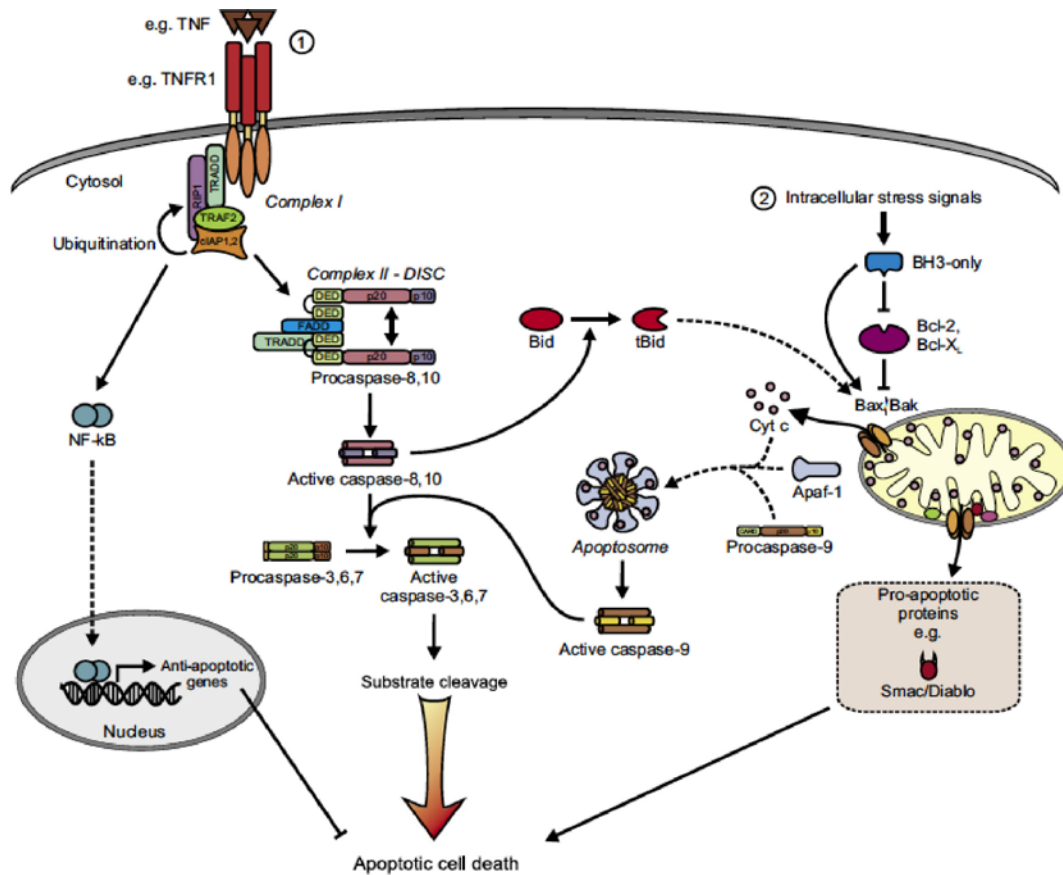


Abb. I.2 TNFR1-vermittelter Apoptose-Signalweg (Duprez et al., 2009)

Der intrinsische Signalweg wird über intrazelluläre Signale, wie Schädigung der DNA, Stress durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder chemotherapeutische Medikamente ausgelöst (Abb I.2). Dieser Signalweg wird durch die pro- und anti-apoptischen Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert (Yin und Ding, 2003). Zu den anti-apoptischen Proteine gehören dabei „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2), „myeloid cell leukemia factor-1“ (Mcl-1), Bcl-w, Bcl-xL und zu den proapoptischen gehören unter anderem „Bcl-2 associated X protein“ (Bax), „Bcl-2 antagonistic killer“ (Bak) und „BH3-interacting domain death agonist“ (Bid).

3.2 Der Tumor Nekrose Faktor (TNF)

TNF bekam 1975 seinen Namen durch die Entdeckung eines Faktors, der in Tumoren Nekrose auslösen kann (Carswell et al., 1975). Er gehört zu einer großen Zytokin-Familie, der TNF Liganden Superfamilie. Neben der Induktion von Apoptose ist TNF vor allem ein pro-inflammatorisches Zytokin. Deshalb ist TNF ein pleiotropes Molekül, das abhängig vom Zelltyp, der Dauer des Signals und der jeweiligen Umgebung eine Vielzahl unterschiedlicher, teils gegensätzlicher Wirkungen vermittelt (Aggarwal, 2003, Locksley et al., 2001). TNF wird dabei z.B. von aktivierten Makrophagen, Monozyten, T und B Zellen, NK Zellen und Neutrophilen als Antwort auf Entzündungen, Verletzungen, Infektionen und anderen Stressfaktoren exprimiert (Baud und Karin, 2001). Wie die meisten Mitglieder der TNF Liganden Superfamilie gibt es zwei Formen von TNF, die membrangebundene (mTNF) und das lösliche Zytokin (sTNF), welche durch proteolytische Spaltung der membrangebundenen Form entsteht (Grell et al., 1995). mTNF Trimere werden in der Zelle gebildet (Tang et al., 1996) und dann zur Zellmembran transportiert, wo sie durch das „TNF-converting enzyme“ (TACE) gespalten werden und so lösliche TNF-Trimere frei werden (Black et al., 1997). Die Mitglieder der TNF Liganden Superfamilie üben ihre biologische Funktionen über die Bindung an die Familie der TNF-Rezeptoren aus (Locksley et al., 2001). TNF-Rezeptor1 (TNFR1) und TNFR2 binden mTNF sowie sTNF, jedoch kann der TNFR2 nur durch die Bindung von mTNF vollständig aktiviert werden (Grell, 1995). Der TNFR1 besitzt eine Protein-Protein Interaktionsdomäne, die „death domain“ (DD) genannt wird (Tartaglia et al., 1993) und kann damit an DDs von anderen Proteinen binden, die so durch Caspasen aktiviert und Apoptose auslösen können (Schulze-Osthoff et al., 1998). Außer der Apoptoseinduktion werden über die Bindung von TNF an den TNFR1 noch viele weitere Signale vermittelt, wie die NF κ B-Aktivierung, Zellwachstum und die Induktion von Adhäsions- und Zytokin-Genen (Parameswaran und Patial, 2010). Der TNFR2 kann ebenfalls nach Ligandenbindung unabhängig von TNFR1 NF κ B aktivieren (Thommesen und Laegreid, 2005) und ist in der Lage, zusammen mit dem TNFR1 zu kooperieren (Wajant et al., 2003). Es wurde noch kein Zelltyp gefunden, der nicht den TNFR1 exprimiert, während der TNFR2 vor allem auf Immunzellen und Endothelzellen vorkommt (Aggarwal, 2003).

3.3 IAP (*engl.* inhibitor of apoptosis protein)

IAPs, auch bekannt als BIRCs (*engl.* Baculovirus IAP Repeat Containing Proteins) sind hoch konservierte Proteine, die wegen ihrer ähnlichen Struktur in eine Familie eingeteilt wurden. Alle IAPs besitzen eine oder mehrere Kopien einer aus 70-80 Aminosäuren bestehenden Domäne, die sich BIR (*engl.* Baculovirus IAP repeat) nennt. Das erste IAP wurde in Baculovirus infizierten Insektenzellen entdeckt, in denen die Apoptose gehemmt war (Crook et al., 1993). So entstand nach ihrer Wirkungsweise auch der Name IAP. Sie wurden in einer Vielzahl von Organismen gefunden, wie Viren, Hefen, Nematoden, Drosophila, Fischen und Säugetieren (Dubrez-Daloz et al., 2008). In der Apoptose-Kaskade ist es sehr wichtig, dass jeder Schritt genau kontrolliert und reguliert wird. Dies kann entweder an einem frühen Zeitpunkt geschehen, indem die Weiterleitung der Todessignale reguliert wird oder durch die direkt Beeinflussung der proteolytischen Aktivität der Caspasen (Kashkar, 2010). Das XIAP (*engl.* x-linked inhibitor of apoptosis protein) bedient sich der zweiten Möglichkeit, indem es direkten Kontakt zu Caspasen aufnimmt (Eckelman und Salvesen, 2006). Im Menschen gibt es acht verschiedene IAPs (Liston et al., 2003), unter ihnen ist aber XIAP das einzige, dass die enzymatische Caspaseaktivität in der Initiator-Phase (Caspase-9) und in der Effektor-Phase (Caspase-3 und -7) hemmen kann (Deveraux et al., 1997; Eckelman et al., 2006). XIAP besitzt drei BIR Domänen (BIR1-3), eine RING-finger Domäne mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität und eine Ubiquitin-Bindungsdomäne (Deveraux et al., 1998; Gyrd-Hansen et al., 2008). Dabei sind die BIR 2 und BIR 3 Domänen für die Caspase-Inhibition verantwortlich (Deveraux et al., 1997; Eckelman et al., 2006). Wenn Caspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert werden, entsteht an der kleinen Untereinheit der gespaltenen Caspasen ein „IAP binding motif“ (IBM). An diese IBM binden die BIR Domänen von XIAP und hemmen so die enzymatische Aktivität der Caspasen (Eckelman et al., 2006). Durch seine Rolle in der Apoptose und dem gehäuften Auftreten in malignen Zellen, wird in XIAP viel Hoffnung als therapeutisches Zielmolekül in der Behandlung von Tumoren gesetzt (LaCasse et al., 2008). Die Regulation von XIAP übernehmen mitochondriale Proteine, die ein IBM besitzen. Dazu gehört SMAC/DIABLO (*engl.* second mitochondria derived activator of caspases/direct iap binding protein with low pi), welches nach pro-apoptotischen Stimuli ins Zytoplasma freigelassen wird (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Das BIM bindet dann an die BIR Domäne der IAPs (Liu et al., 2000; Wu et al., 2000). cIAP1 und cIAP2 inhibieren dagegen die Caspasen nicht direkt, sondern können mit TRAF2 interagieren und so mit dem TNFR1 in Verbindung treten (Duprez

et al., 2009). cIAP1+2 können dann RIP1 ubiquitinieren und so zur NF κ B-Aktivierung beitragen (LaCasse et al., 2008).

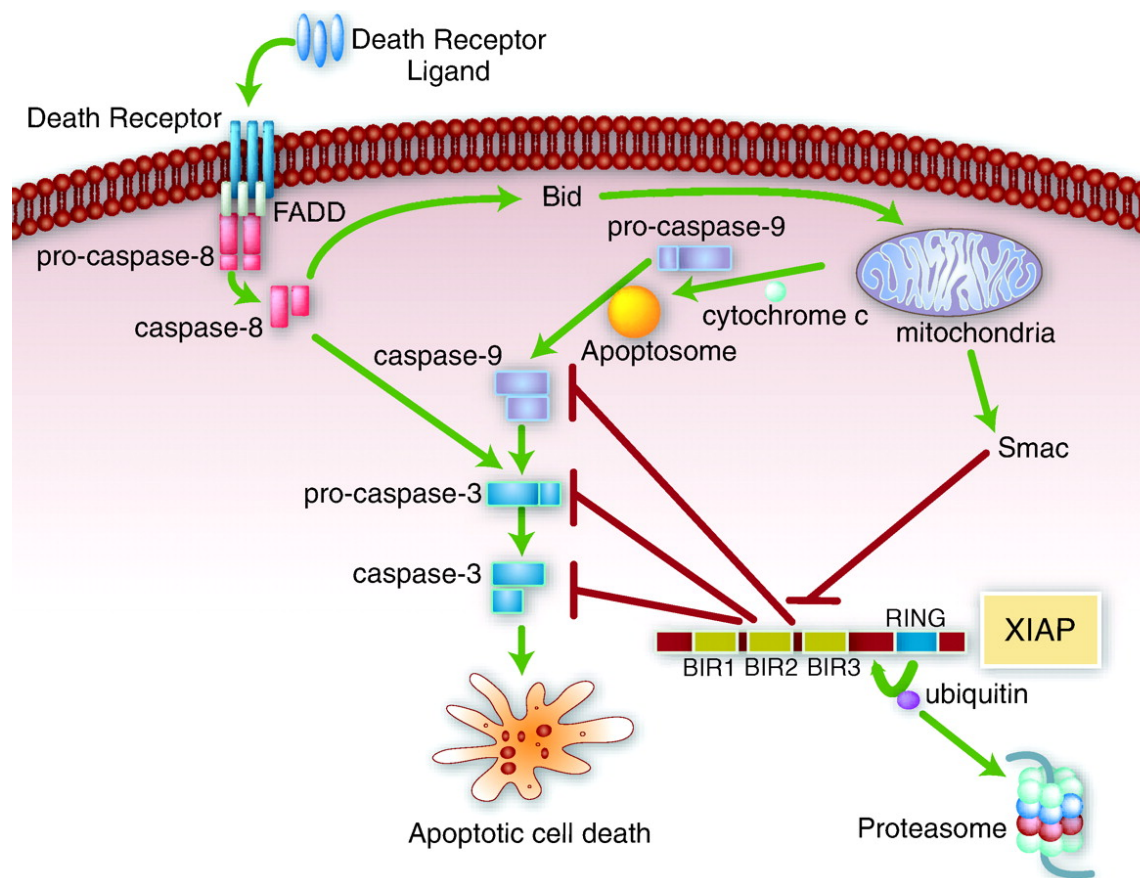


Abb. I.3 Hemmung der Caspasen-3 und -9 durch XIAP (Cheung et al., 2006)

II. Fragestellung

Die Leber spielt eine wichtige Rolle in der lokalen Immunregulation. Sie vermittelt Toleranz gegen harmlose Nahrungsmittelantigene, muss aber auch bei Infektionen mit z.B. hepatotropen Viren, wie HBV und HCV, eine Immunantwort generieren. LSEC vermitteln durch die Kreuzpräsentation von Nahrungsmittelantigenen Toleranz in naiven T Zellen. Um eine virusinfizierte Zelle zu eliminieren müssen CD8 T Zellen zu zytotoxischen Effektor T Zellen reifen. Dies geschieht meist durch „cross priming“ in lymphatischen Organen. Die so gereiften zytotoxischen T Zellen wandern dann zurück in die Leber, um dort die infizierte Zielzelle zu eliminieren. Um ihre Effektorfunktionen ausüben zu können, müssen die zytotoxischen T Zellen durch die Präsentation des Antigens aktiviert werden. Da die Hepatozyten durch die LSEC keinen direkten Kontakt zum Blutstrom und somit zu den zytotoxischen T Zellen bekommen und nur durch die Fenestrae der LSEC dieser Kontakt möglich ist, stellte sich die Frage, ob dieser Kontakt ausreicht um alle infizierten Hepatozyten zu töten. Somit ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Werden infizierte Hepatozyten durch die zytotoxischen T Zellen eliminiert wenn sie überhaupt kein virales Antigen präsentieren können?
2. Können LSEC auch virales Antigen präsentieren und führt das zur Stimulation von zytotoxischen T Zellen und der Aktivierung von Effektorfunktionen?
3. Spielen auch andere Zellpopulationen der Leber für die Präsentation der viralen Antigene eine Rolle?
4. Welche Effektorfunktion der zytotoxischen T Zellen ist wichtig für die Eliminierung der infizierten Hepatozyten?
5. Welche molekularen Mechanismen führen in infizierten Hepatozyten zum Zelltod?

Um diese Fragen zu beantworten wurde ein virales Hepatitismodell entwickelt, das es ermöglicht mittels einer Adenovirus-Infektion und dem Transfer von zytotoxischen T Zellen eine antigenspezifische virale Hepatitis auszulösen.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Analysewaagen	PT 600, CP 224 S-OCE, CD 2201 (Sartorius, Göttingen)
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bestrahlungsgerät	Biobeam 2000 (MCP-STs, Braunschweig)
Brutschränke	Hera cell, Hera cell 240 (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	Cantoll (Becton Dickinson, Heidelberg)
Eismaschine	Icematic (Scotsman®, Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 cell (Bio-Rad, München)
ELISA-Reader	Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
Entwicklerkassette für Western Blots	Hypercassette (Amersham über GE Healthcare, Freiburg)
Entwicklermaschine	Curix 60 (AGFA, Morsel, Belgien)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Gewindeflaschen	100ml, 250ml, 500ml, 1l, 2l (Schott, Mainz)
Magnetrührer	Heidolph MR 3002 (Heidolph Electro GmbH, Keilheim)
Messkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l (Schott, Mainz)
Messzylinder	Rotilabo 50ml, 100ml, 500ml, 1l (Roth, Karlsruhe)
Mikroskope	DM IL (Leica, Wetzlar), IX71, CKX41, TH4-200 (Olympus, Hamburg)
Perfusionspumpe	Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein)
pH-Meter	pH 330 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipetten	0,2-2µl, 0,5-10µl, 2-20µl, 20-200µl, 200-1000µl (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) Transferpipette (Brand, Wertheim) HandyStep (Brand, Wertheim)
Pipettierhilfe	Matrix Technologies CellMate® (Thermo Scientific, USA)
Präparationsbesteck	Labotec, Labor-Technik, Göttingen
Reflexionsphotometer	Reflotron Plus (Roche, Mannheim)

Reinstwasseranlage	NANOpure Diamond, Barnstead (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen)
Rotoren	#6445 (Heraeus, Hanau); SW32 03U501 (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Schüttler	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Schüttelwasserbad	GFL® 1092 (GFL®, Burgwedel)
Semidry Blotter	TE77 (Amersham über GE Healthcare, Freiburg)
Siebe, Metall-	Universität Bonn, Abt. Feinmechanik
Sonifikator, Stab-	UW2070/Sonoplus (Bandeln electronic, Berlin)
Spannungsquelle	EPS 601 (Amersham über GE Healthcare, Freiburg)
Tischschwenker	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Wasserbäder	TW8 (Julabo, Seelbach)
Werkbank, steril	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer (La Fontaine über Labotec, Labor-Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Multifuge 3s-r, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x46mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Dialyse-Kassetten	Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, Rockford, USA)
Einmalröhrchen	PP-Röhrchen 50ml steril, PP-Röhrchen 15ml steril (Greiner bio-one, Solingen)
FACS Röhrchen	Polystren 12/75mm (BD, Heidelberg und Sarstedt, Nümbrecht)
Filterpapier	Whatman Chromatography Paper (GE Healthcare, Freiburg)
Fotofilme	Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Freiburg),
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK-Kapillaren (Brand GmbH, Wertheim) Capilette für Replotron 32µl (Selzer Labortechnik, Waghäusel)
Handschuhe, Einmal-	DermaClean (Ansell, Brüssel, Belgien)
Kanülen	0,4x19mm 27G (grau), 0,5x25mm 25G (orange) (BD Microlance, Heidelberg) 0,90x120mm (TSK-supra, Vertrieb durch Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen)
Kryoröhrchen	1 ml (Nunc, Wiesbaden)

Messpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6- 24-, 96- Loch (Nunc, Wiesbaden; bio-one, Solingen; TPP, Trasadingen, Schweiz und Costar/Corning, USA)
OP-Masken	Foliodress®mask (Hartmann, Heidenheim)
Parafilm	Parafilm „M“ ® (Amerikan National Can TM, Greenwich, USA)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10cm (greiner bio-one, Solingen)
Pipettenspitzen	Standardtips 10µl, 100µl, 1000µl (greiner bio-one, Solingen)
Polyamidsiebgewebe	„Gaze“ 40µm (über Labomedic, Bonn)
PVDF Membran	Polyvinylidenfluoride Membran (Amersham über GE Healthcare, Freiburg)
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Skalpelle	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	2ml, 5ml, 10ml, 20ml BD Discardit™II (BD, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2µm (Schleicher&Schuell, Einbeck und BD, Heidelberg)
Ultrazentrifugenröhrchen	14x89mm (Beckmann Coulter, Palo Alto, USA)
Venenverweilkanülen	0,6x19mm 16G (violett) Vasculon Plus (BD, Heidelberg)
Zellkulturplatten	150x20mm (Sarstedt, Nümbrecht)

1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Applichem, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
BrefeldinA	eBioscience, San Diego, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Applichem, Darmstadt
Clodronate Liposomen	von Dr. Nico van Rooijen, Amsterdam
DMEM-Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
ECL	Amersham über GE Healthcare, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Applichem, Darmstadt

FlowCytomix Multiplex Kit	Bender MedSystems über eBioscience, San Diego, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Glycin	Applichem, Darmstadt
HBSS	PAN Biotech, Passau
H ₂ DCFDA	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin	Ratiopharm, Ulm
GBBS	PAA, Pasching, Österreich
Glutamin (200mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isofluran	DeltaSelect, Pfullingen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Ketamin	Medistar, Ascheberg
Lymphozyten-Separationsmedium	Nycomed Pharma, Unterschleiss- heim
Luziferin	Caliper Lifesciences, Rüsselsheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Monensin	eBioscience, San Diego, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Nycodenz	Axis-Shield, Norwegen
Ovalbumin	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	Fluca, Buchs
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Percoll	Amersham über GE Healthcare, Freiburg
Proteingrößenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein Assay Reagent	Bio-RAD, München
RPMI 1640-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Applichem, Darmstadt
TMB	Thermo Scientific, Rockford, USA

Tris	Roth, Karlsruhe
TNF	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween20	Roth, Karlsruhe
William's Medium-E	PAN Biotech, Aidenbach
Xylazin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

1.4 Allgemeine Lösungen

1.4.1 Medien

LSEC-Medium	DMEM high Glucose (4500mg/l) 10% (v/v) FCS 4mM L-Glutamin 10 ⁵ U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
-------------	--

T Zell-Medium	RPMI 1640 8% (v/v) FCS 1% (v/v) 2-Merkaptoethanol 4mM L-Glutamin 10 ⁵ U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
---------------	--

Zelllinien-Medium	DMEM high Glucose (4500mg/l) 8% (v/v) FCS 4mM L-Glutamin 10 ⁵ U Penicillin 0,1g/l Streptomycin
-------------------	---

1.4.2 Puffer

ACK Lysepuffer	16,58g NH ₄ Cl
----------------	---------------------------

	2g KHCO_3 74,4mg Na_2EDTA 2000ml H_2O
Cäsiumchlorid (CsCl) Lösung	10mM Tris/HCl pH 7,8 20mM MgCl_2 H_2O Dichte 1,25: + 36,16g/100ml CsCl Dichte 1,34: + 51,20 g/100ml CsCl Dichte 1,40: + 62,00 g/100ml CsCl
Dialysepuffer	10x Ansatz 300g Sucrose (30%w/v) 87,7g NaCl 20,3g MgCl_2 100ml 1 M Tris/HCl pH 7,8 ad 1000ml H_2O pH 7,8
ELISA-Bindungspuffer	0,1M Na_2HPO_4 H_2O pH 9,0
ELISA-Blockierungspuffer	PBS 1% (w/v) BSA
ELISA-Waschpuffer	PBS 0,05% Tween
EDTA (0,5M)	186,1g EDTA ca. 20g NaOH 1000ml H_2O pH 7,8-8,0
FACS-Puffer	PBS 1% (v/v) FCS 2mM EDTA

Kollagenasepuffer Hepatozyten-isolation	<p>Willams Medium E</p> <p>0,4M CaCl₂</p> <p>0,12IE Kollagenase/ml</p>
MACS-Puffer	<p>PBS</p> <p>1% (v/v) FCS</p> <p>2mM EDTA</p> <p>pH 7,2</p>
PBS (phosphate buffered saline)	<p>80g/l NaCl</p> <p>0,2g/l KCl</p> <p>1,44g/l NaHPO₄x 2H₂O</p> <p>0,2g/l KH₂PO₄</p> <p>pH 7,4</p> <p>(Biochrom, Berlin)</p>
Perfusionspuffer LSEC	<p>0,01g L-Asparaginsäure</p> <p>0,02g L-Threonin</p> <p>0,03g L-Serin</p> <p>0,04g Glycin</p> <p>0,05g L-Alanin</p> <p>0,13g L-Glutaminsäure</p> <p>0,13g L-Glutamin</p> <p>3,6g D-(+)-Glukose</p> <p>3,6g Fruktose</p> <p>67,4g Sucrose</p> <p>0,22g KCl</p> <p>0,1g NaH₂PO₄ x H₂O</p> <p>0,1g MgCl₂ x 6 H₂O</p> <p>2,4g HEPES</p> <p>2,0g NaHCO₃</p> <p>1000ml H₂O</p> <p>0,05% (v/v) Kollagenase</p>
Präperfusionspuffer Hepatozyten-isolation	<p>HBSS</p> <p>0,5mM EDTA</p> <p>10IE Heparin/ml</p>

Protein-Laufpuffer	0,58 M Sucrose 4% SDS 0,04% Bromphenolblau 62,5mM Tris/HCL pH 6,8
Saponin-Puffer	FACS-Puffer 0,5% (w/v) Saponin
SDS-Laufpuffer	3g Tris 14,4g Glycin 1g SDS ad 1000ml H ₂ O
TBS/T (Tris bufferd saline/Tween)	2,42g Tris 8g NaCl 0,1% Tween ad 1000ml H ₂ O pH 7,6
Towbin Puffer	SDS-Laufpuffer 20% Methanol
Lysepuffer	Laufpuffer 60mg/ml DTT

1.5 Antikörper

1.5.1 Antikörper für Durchflusszytometrie und ELISA

Folgende Antikörper gegen murine Epitope wurden verwendet. Diese wurden mit einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC, Alexa 647), biotinyliert oder unkonjugiert eingesetzt.

Antigen	Isotyp	Klon	Anmerkung	Firma
CD8 α	IgG2a κ , Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	= Integrin α X Kette	BD
F4-80	IgG2a κ , Ratte	BM8		eBioscience
H-2K ^b	IgG2a κ , Ratte	AF6-88.5	anti-MHC-I	BD
IL-2	IgG2a κ , Ratte	JES6-1A12	ELISA 1. Ak	eBioscience
IL-2	IgG2b κ , Ratte	JES6-5H3	ELISA 2. Ak Biotin konjugiert	eBioscience
Isotyp	IgG1 κ , Ratte			eBioscience
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1	anti-LSEC	eigene Herstellung
NK1.1	IgG2a κ , Maus	PK136	zur Depletion <i>in vivo</i> eingesetzt	eigene Herstellung
TNF	IgG1 κ , Ratte	MP6-XT22		eBioscience
V α 2 TCR	IgG2a λ , Ratte	B20.1	OT-1 TCR	BD
V β 5 TCR	IgG1 κ , Maus	MR9-4	OT-1 TCR	BD

1.5.2 Western Blot Antikörper

Caspase-3	Cell Signaling, Danvers, USA
Caspase-9	Cell Signaling, Danvers, USA
Bax	Cell Signaling, Danvers, USA
tBid	von Thomas Kaufmann zur Verfügung gestellt
XIAP	Cell Signaling, Danvers, USA
Beta-Aktin	Sigma-Aldrich, Steinheim

1.6 Magnetische Kügelchen (MACS-Beads)

α -ME9F1 (α -CD146) Beads Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

1.7 Enzyme

Kollagenase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
---------------	--------------------------

Peroxidase	Pierce, Bonn
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

1.8 PRR-Liganden

TLR3	polyIC (Sigma-Aldrich, Steinheim)
TLR4	LPS (Sigma-Aldrich, Steinheim)
TLR7	9.2s RNA (biomers.net, Ulm)
TLR9	CpG 1668 (TIB Molbiol, Berlin)
RIG-I	3pRNA (von Prof. Hartmann, Institut für Klinische Pharmakologie und Biochemie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt)
AIM2	poly-dAdT (Amersham, Freiburg)

1.9 Inhibitoren

Caspase Inhibitoren:

Pan-Caspase Q-VD-OPH	Biovision, Mountain View, USA
Caspase-8 Z-IED-FMK	Biovision, Mountain View, USA
Caspase-9 Z-IED-FMK	Biovision, Mountain View, USA

ROS-Inhibitoren:

Trolox	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Luteolin	Calbiochem (Merck), Darmstadt
MnTBAP	Alexis (Enzo Life Science), Lössach

1.10 Viren

AdOVA	E1 und E3 deletierter adenoviraler Vektor, der OVA, GFP und Luziferase unter einem CMV-Promoter exprimiert (eigene Herstellung).
AdGFP	E1 und E3 deletierter adenoviraler Vektor, GFP CMV-Promoter exprimiert (eigene Herstellung).
AdXIAP	Adenoviraler Vektor, der XIAP (<i>engl.</i> x-linked inhibitor of apoptosis protein) unter einem CMV-Promoter exprimiert (von Vector Biolabs, Philadelphia, USA).

AdSOD	Adenoviraler Vektor, der SOD (Superoxiddismutase) unter einem CMV-Promoter exprimiert (von Vector Biolabs, Philadelphia, USA).
LCMV	von Karl Lang, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

1.11 Zelllinien

B3Z	CD8 ⁺ T- Zellhybridoma generiert aus einem CD8 ⁺ T-Zellklon, dessen T-Zellrezeptor (TZR) spezifisch das OVA257-264 Peptid, präsentiert auf H-2K ^b , erkennt. Die Zellen produzieren bei Aktivierung IL-2.
HEK 293	HEK 293-Zellen (Human Embryonic Kidney) wurden aus humanen embryonalen Nierenzellen durch Transformation mit dem Adenovirus Typ 5 generiert (Graham et al., 1977).
HepG2	HepG2 Zellen wurden aus einem hepatozellulärem Karzinom eines Menschen generiert.

1.12 Mauslinien

C57BL/6 (Wildtyp)	Inzuchtstamm mit dem MHC I Haplotyp H-2K ^b (aus eigener Zucht).
DBA/2	MHC I Haplotyp H-2K ^d (gekauft von Charles River).
Tie2-K ^b	MHC I Haplotyp H-2K ^b unter der Kontrolle eines Tie2 Promoters. H-2K ^b -Expression ausschließlich auf Endothelzellen (aus eigener Zucht).
CRP-K ^b	MHC I Haplotyp H-2K ^b unter der Kontrolle eines CRP Promoters. H-2K ^b -Expression ausschließlich auf Hepatozyten (aus eigener Zucht).
OT-I	CD8 T Zell transgene Mauslinie. H-2K ^b ^{SIINFEKL} -restringierter V α 2V β 5 T Zell-Rezeptor, aus eigener Zucht. OT-I Mäuse exprimieren auf den meisten ihrer CD8 ⁺ T Zellen einen transgenen T Zell Rezeptor, der spezifisch ist für das Peptid SIINFEKL gebunden an das H-2K ^b Molekül (aus eigener Zucht).
TNFR1/2 ^{-/-}	„knock out“ des TNF-Rezeptors 1 und 2 (aus eigener Zucht).
CD11c-DTR	Deletion von CD11c exprimierenden Zellen nach Diphtheria Toxin Applikation (aus eigener Zucht).
IFNAR ^{-/-}	„knock out“ des Interferon α/β -Rezeptors (aus eigener Zucht).
IFN γ R ^{-/-}	„knock out“ des Interferon γ -Rezeptors (von Irmgard Förster, Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt).

FADD ^{fl/fl} x AFP-CRE ^{+/+}	Die Cre-Rekombinase wird unter der Kontrolle des AFP (alpha 1 Föto- protein) Promoters exprimiert und entfernt das mit loxP-Stellen flankierte FADD-Gen (von Manolis Pasparakis, Köln zur Verfügung gestellt).
FADD ^{fl/fl} x AFP-CRE ^{-/-}	Geschwister der FADD ^{fl/fl} x AFP-CRE ^{+/+} Mäuse, die keine Cre- Rekombinase exprimieren und funktionell Wildtyp Mäusen gleichen (von Manolis Pasparakis, Köln zur Verfügung gestellt).
gp91NOX ^{-/-}	„knock out“ der NADPH-Oxidase gp91/NOX2 (von Martin Krönke Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln zur Verfügung gestellt).

Alle Versuchstiere, die nicht von anderen Instituten stammten, wurden im „Haus für Experimentelle Therapie“ (HET) oder IMMEI am Universitätsklinikum Bonn unter SPF- (*engl.* specific pathogen free) Konditionen gezüchtet und gehalten.

2. Methoden

2.1 Zellisolation

Zur Entnahme von Organen wurden die Versuchstiere durch Begasung mit CO₂ getötet, der Körper mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und anschließend die Leibeshöhle geöffnet.

2.1.1 Aufreinigung von LSEC aus der Leber

Nach dem Öffnen des Peritonealraums wurde die Pfortader (*Vena porta*) freigelegt. Die Kanüle wurde in die Pfortader eingeführt, die *Vena cava* durchtrennt und die Leber mit der Perfusionslösung mit einer Geschwindigkeit von 3ml/Min für ca. 10Sek. perfundiert. Anschließend wurde die Gallenblase durchtrennt, die Leber entnommen und in ein Gefäß mit GBSS überführt. Die mit Kollagenase perfundierten Lebern wurden in eine Petrischale überführt, mit einer gekrümmten Schere zerkleinert und anschließend im Schüttelwasserbad bei 250Upm 20Min. lang in GBSS/4% Kollagenase bei 37°C verdaut. Die Suspension wurde anschließend durch ein Sieb gedrückt und mit GBSS zweimal gewaschen. Über Dichte-Zentrifugation wurden dann die Parenchymzellen (Hepatozyten) von den anderen Zellen der Leber getrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch im Verhältnis 1:1,23 in Nycodenz gemischt (dies entspricht einer Dichte von 1,089g/cm³) und bei 1400xg bei 20°C für 20Min. ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase abgenommen und in GBSS gewaschen. Die Zellen wurden dann in kaltem MACS-Puffer resuspendiert (200µl pro Leber) und 25µl anti-ME9F1 Beads pro Leber hinzugefügt. Nach 15-20Min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen einmal mit MACS-Puffer gewaschen, durch ein Gaze-Sieb gefiltert und mittels AutoMACS aufgereinigt. Die positive Fraktion wurde anschließend zentrifugiert, in LSEC-Medium resuspendiert, gezählt, ausgesät und kultiviert.

2.1.2 Die Isolation von Kupffer Zellen aus der Leber

Die Aufreinigung von Kupffer Zellen aus der Leber ist bis zum Schritt der Dichte-Zentrifugation mit der LSEC-Aufreinigung identisch. Statt dem Nycodenz wurde für die Kupffer Zell Separation ein Percoll-Gradient benutzt. Hierbei wurden zuerst 20ml einer 25%igen Percoll-Lösung in ein 50ml Falcon vorgelegt und anschließend mit 15ml einer 50%igen Percoll-Lösung unterschichtet. Danach wurde die Leberzellsuspension in 10ml PBS vorsichtig auf den Gradienten pipettiert (Abb. III.1). Die Zentrifugation

erfolgte bei 1349g für 30Min bei 4°C ohne Bremse. Die Interphase (Abb. III.1), in der sich die Kupffer Zellen befinden, wurde abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Kupffer Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und für eine durchflusszytometrische Untersuchung weiterverarbeitet.

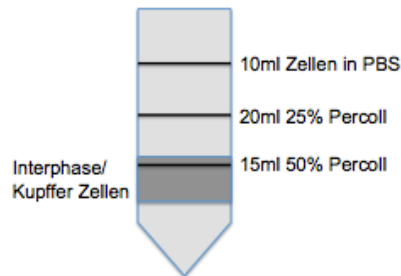


Abb. III.1 Dichte-Gradient für die Kupffer Zell Aufreinigung

2.1.3 Hepatozytenisolation

Der Peritonealraum des Versuchstieres wurde geöffnet und die Pfortader (*Vena porta*) freigelegt. Die Venenverweilkanüle wurde in die Pfortader eingeführt und mit einem Faden fixiert. Dann wurde die *Vena cava* durchtrennt und die Leber mit der Präperfusionslösung für 10Min. mit einer Geschwindigkeit von 4ml/Min perfundiert. Anschließend erfolgte eine zweite Perfusion für 10Min. mit einer 0,05%igen Kollagenaselösung. Danach wurde die Leber entnommen und in eine Petrischale gelegt. Dort wurde mit einer Pinzette die Oberflächenstruktur der Leber zerstört und die Zellen mit HBSS durch ein Sieb (250µm) gespült und bei 300Upm für 5Min. zentrifugiert. Um die toten von den lebenden Zellen abzutrennen, wurden das Zellpellet in 2,5ml HBSS und 4,7ml 80% Percoll aufgenommen und mit 5ml 80% Percoll unterschichtet und zentrifugiert (600xg, 20Min., 20°C, ohne Bremse). Die obere Phase (tote Zellen) wurde verworfen und die untere Phase (lebende Hepatozyten) mit HBSS gewaschen und in 5ml Hepatozytenmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Hepatozyten wurden dann entweder für einen Western Blot in Lysepuffer aufgenommen oder in 24Loch Platten ausgesät.

2.1.4 Isolation von Lymphozyten aus der Leber

Die entnommen Lebern wurden durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1500Upm, 10Min., 20°). Anschließend wurden die Zellen in 4ml 40% Percolllösung resuspendiert, mit 2ml 80% Percolllösung unterschichtet und bei

2000Upm, 20°C, 20Min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die oberste Zellschicht (Hepatozyten) abgenommen und verworfen. Die Interphase, in der sich die Lymphozyten befinden, wurde abgenommen und mit PBS gewaschen. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden die Zellen für 2Min. in einem isotonen Puffer (Ack-Puffer) inkubiert und danach in PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in GBSS oder FACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.1.5 Die Isolation und Aktivierung von OT-I T Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die Milzen und Lymphknoten von OT-I transgenen Mäusen wurden entnommen und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb gedrückt, mit PBS gespült und zentrifugiert (350xg, 10Min., 20°). Das Zellpellet wurde mit 2ml Ack-Puffer für 2Min. inkubiert und danach in 20ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (350xg, 10Min., 20°). Danach wurde das Zellpellet in T Zell Medium aufgenommen, durch ein Gaze-Sieb filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in T Zell Medium resuspendiert, durch ein Gaze-Sieb gefiltert und gezählt. Anschließend wurden 2×10^9 Zellen/175cm² Flasche (Gesamtvolumen 50ml) bzw. 1×10^8 Zellen/75cm² Flasche (Gesamtvolumen 20 ml) ausgesät und zur Aktivierung der OT-I T Zellen in jede Flasche 0,5mg/ml OVA zugegeben. Nach 24Std. wurden jeweils die Hälfte des Mediums entnommen und zentrifugiert (1500Upm, 10Min., 20°C). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und 20U/ml IL-2 zugegeben. Dies wurde nach drei Tagen wiederholt. An Tag 5 wurden die Zellen gesammelt und zentrifugiert (1500Upm, 10Min., 20°). Zur Beseitigung von toten Zellen wurden die Zellen in 5 ml T-Zell Medium resuspendiert, mit 2ml Lymphozytenseparationsmedium unterschichtet und bei 2000Upm für 10Min. zentrifugiert. Die Interphase wurde anschließend entnommen, mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die so aktivierten OT-I T Zellen wurden dann zur Induktion der viralen Hepatitis in die infizierten Mäuse gespritzt.

2.2 ROS Bestimmung mittels H₂DCFDA Färbung

Die aufgereinigten Lymphozyten, Hepatozyten und Kupffer Zellen der Leber wurden einmal mit HBSS gewaschen und zentrifugiert (300Upm, 5Min., 20°C). Anschließend wurden die Zellen in 20µm H₂DCFDA in HBSS aufgenommen, dann jeweils 2×10^5 Zellen (insgesamt 200µl Gesamtvolumen) pro 96-Loch verteilt und 30Min. bei 37°C inkubiert. 150µl des Überstandes wurden abgenommen und entweder mit 50ng/ml TNF

oder als Positivkontrolle mit 1mM H_2O_2 für 15Min. bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde nur HBSS zugegeben. Danach wurde die FITC-Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenz-ELISA-Readers bestimmt.

2.3 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine die zuvor in einer Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert. Die Immobilisierung auf einer Membran ermöglicht den weiteren immunologischen Nachweis eines bestimmten Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper.

So wurden hier frisch isolierte Hepatozyten in Lysepuffer unter vortexen lysiert und für 10Min. bei 95°C aufgekocht. Um DNA zu zerkleinern wurden die Proben für 5 Sek. mit einem Ultraschallstab (Sonifikator) beschallt und anschließend bei 13000Upm zentrifugiert.

Proteinbestimmung

Es wurden 5µl der Probe mit 20µl Proteinauftragspuffer gemischt und anschließend mit 30µl Trichloressigsäure versetzt. Dann wurden die Proben für 10Min. bei -20°C inkubiert und bei 13000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Proteinpellet mit Aceton gewaschen und getrocknet. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem DC Protein Assay Kit von Biorad. Dabei wurde das getrocknete Proteinpellet mit 125µl der Lösung A aufgenommen und mit 1ml der Lösung B versetzt. Nach 20Min. wurde die Absorption bei 600nm gemessen.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte über ein Polyacrylamidgel, welches aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestand.

Trenngel	8%	12%
30% Acrylamid	5,33ml	8ml
H ₂ O bidest	9,16ml	6,49
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	5ml	5ml
10% SDS	200µl	200µl
3% APS	300µl	300µl
TEMED	10µl	10µl

Das Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet, welches nach der Polymerisation wiederabgegossen wurde. Danach erfolgte das Mischen und Gießen des Sammelgels.

Sammelgel	3,7%
30% Acrylamid	1,23ml
H ₂ O bidest.	5,8ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	2,5ml
10% SDS	100µl
3% APS	250µl
TEMED	8µl

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde es in die Laufkammer gestellt und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Dann wurden jeweils 20µg Protein verdünnt in Laufpuffer in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte dann bei 600V 34mA 2-3Std.

Blot

Das Gel, auf dem nun die Proteine aufgetrennt vorlagen, wurde dann mit Hilfe einer Blotkammer auf eine Membran überführt. Die Polyvinylidenfluoride (PVDF) Membran wurde dafür zuerst mit Methanol befeuchtet und kurz in Towbin Puffer äquilibriert. Das Filterpapier wurde ebenfalls in Towbin Puffer eingelegt und folgendermaßen in die Blotkammer geschichtet:

Anode

3 x Filterpapier

Membran

Gel

3 x Filterpapier

Katode

Um Luftblasen zu vermeiden wurde das Filterpapier immer glatt gestrichen. Die Blotkammer wurde geschlossen und an die Spannungsquelle angeschlossen. Dabei richtet sich die mAmpere Stärke nach der Größe des Gels. Es werden 1mA/cm² benötigt, was für ein Gel mit der Länge 10cm und der von Breite 7,5cm eine Stromstärke von 75mA ergeben würde.

Detektion:

Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurde die Membran für 30Min. in 10% Milchpulver in TBS/T schwenkend inkubiert und kurz in TBS/T gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper für 14-16Std. über Nacht, bei 4°C, unter ständigem Schwenken. Danach wurde die Membran dreimal in TBS/T für jeweils 10Min. unter Schwenken gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (in 5% Milchpulver in TBS/T) für 1Std. bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal in TBS/T für jeweils 10Min. gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Chemilumineszenz-Detektionskit von Amersham nach Herstellerangaben behandelt und in einer Entwicklerkassette mit einem Fotofilm entwickelt.

2.4 Durchflusszytometrie

Diese Methode ermöglicht die Analyse einzelner Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Immunfluoreszenzfärbung. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare einzeln an monochromatischen Lasern vorbei geführt (Argonlaser $\lambda = 488\text{nm}$, bzw. Helium-Neon Laser $\lambda = 635\text{nm}$). Das dabei gestreute Licht wird von Photozellen detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. Dabei gibt das Licht, welches in einem Winkel von 2-10° von der Zelle aus detektiert wird (FCS, forward scatter), Auskunft über die Größe der Zelle. Licht, welches in einem Winkel von 90° detektiert wird, erlaubt eine Aussage über die Granularität der Zelle (SSC, sideward scatter). Die Elektronen von Fluoreszenzfarbstoffen werden durch Licht des Laserstrahles in einen kurzfristig angeregten Zustand versetzt. Daraufhin fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird durch den Einsatz bestimmter Filter von den Sensoren als positives Signal detektiert. Da die Fluoreszenzfarbstoffe an Antikörper konjugiert sind, die an spezifische Oberflächenmoleküle von Zellen binden, erlaubt dies die Analyse einzelner Zellen in einem Zellgemisch.

2.4.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Die Zellen wurden zur Oberflächenfärbung in FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 100µl in ein FACS-Röhrchen oder 50µl in eine 96-Loch Platte überführt. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:400 zu den Zellen gegeben und für 15Min. bei 4°C inkubiert. Zur Blockierung der Fcγ-Rezeptoren wurde in alle Ansätze anti-CD16/CD32 Antikörper (2.4G2) in einer 1:100 Verdünnung zugegeben.

Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (1600UpM, 3Min., 4°C) und durchflusszytometrisch analysiert. Um tote Zellen auszuschließen, wurde wenige Minuten vor der Analyse am Durchflusszytometer der Farbstoff Hoechst in einer Endkonzentration von 10µg/ml zugegeben. Erfolgte die Analyse erst am darauf folgenden Tag, so wurden die Zellen für 10Min. in 4% PFA fixiert und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert und aufbewahrt.

2.4.2 Intrazelluläre Färbung von Antigenen

Sollten auch intrazellulärer Antigene gefärbt werden, wurden nach der oben beschriebenen Oberflächenfärbung die Zellen mit 4% PFA für 10Min. auf Eis fixiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation in Saponin-Puffer für 10Min. auf Eis. Danach wurden die in Saponin-Puffer verdünnten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 30Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5 ELISA

2.5.1 „Sandwich“-ELISA

Beim sogenannten „Sandwich“-ELISA lässt sich die Konzentration eines bestimmten Proteins in einem Gemisch bestimmen. Dabei wird an die Oberfläche einer 96-Loch Platte ein Antikörper (Primärantikörper) gegen ein bestimmtes Protein gebunden. Nach Zugabe des Proteingemisches bindet das zu untersuchende Protein an den Antikörper. Danach wird ein weiterer Antikörper (Sekundärantikörper) gegen das Protein zugegeben, welcher zusätzlich an Biotin gekoppelt ist. Durch Zugabe des Enzyms Peroxidase, welches an Streptavidin gebunden ist, erfolgt eine Enzymreaktion, da Streptavidin an das Biotin am Sekundärantikörper bindet. Dabei entsteht ein farblicher Niederschlag, welcher anhand seiner Lichtabsorption einer bestimmten Wellenlänge (λ = 650nm) quantitativ bestimmt werden kann, wobei die Absorption direkt mit der Menge an gebundenem Protein korreliert. Durch Vergleich der Menge mit einer Verdünnungsreihe des Proteins mit bekannter Konzentration (Standard) kann die Konzentration des Proteins in dem Gemisch bestimmt werden.

Der Primärantikörper wurde 1:500 in Bindungspuffer verdünnt und anschließend in die entsprechende Anzahl von Löchern einer 96-Loch Platte pipettiert. Nach 1Std.

Inkubation bei 37°C wurde der Antikörper entfernt, die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 30Min. bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Platte abzusättigen. Danach wurde die Platte gewaschen und die Proteinlösung bzw. der Standard (Konzentration 80ng/ml, Verdünnungsschritte 1:3) zugegeben. Die Inkubation erfolgte 1Std. bei 37°C. Dann wurde die Platte gewaschen, der Sekundärantikörper für 1Std. bei 37°C zugegeben (1:500 in Blockierungspuffer) und anschließend wieder gewaschen. Danach wurde für 30Min. die Platte mit der Peroxidase bei RT inkubiert, gewaschen, die Substratlösung TMB zugegeben und sofort im ELISA-Reader analysiert.

2.5.2 Bead Assay

Bei diesem FlowCytomix Assay von Bender MedSystems werden fluoreszierende „Beads“ mit Antikörpern gegen das zu testende Zytokin gekoppelt. Durch die Inkubation der zu testenden Zellkulturüberstände oder des Serums, binden diese Beads mittels der Antikörper an die Zytokine. Durch die unterschiedliche Größe und Fluoreszenzstärke der Beads können mittels Durchflusszytometer zehn verschiedene Zytokine aus einer Probe gleichzeitig gemessen werden

Die Durchführung dieses Tests wurde mit Zellkulturüberständen nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6 Leberhistologie

Lebern wurden für 2Min. mit 4% PFA Paraformaldehyd perfundiert und in 10% neutral gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden HE (Hämalaun Eosin) gefärbt. Die Einbettung in Paraffin, sowie die Anfertigung der Leberschnitte und die Färbung (HE, TUNEL, Elektronenmikroskopie) erfolgte durch Frau Dr. Margarete Odenthal am Institut für Pathologie der Universität Köln.

2.6.1 TUNEL-Färbung

Die TUNEL- (*engl.* TdT-mediated dUTP nicked end labeling) Färbung dient der Darstellung apoptotischer Zellkerne. Bei der Apoptose entstehen durch DNA-Strangbrüche freie 3'OH-Enden, die mittels einer enzymatischen Reaktion mit TdT (*engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase) und einem AP (alkalische Phosphatase

gekoppeltem Antikörper detektiert werden können. Die Leberschnitte wurden hierfür mit Proteinase K behandelt (2mg/ml Proteinase K in 10mM EDTA, 50mM TRIS pH 8,0). Danach wurde die TUNEL-Färbung nach der Anleitung des Herstellers (Roche, Mannheim) durchgeführt. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase, mittels des präzipitierenden Substrats Fast Red (Dako, Hamburg), entwickelt. Dann wurden die Schnitte mit Anti-GFP rabbit Antikörpern (Abcam, Camebridge, UK) in einer 1:3000 Verdünnung inkubiert. Die GFP Immunofärbung wurde mit einem Peroxidase gekoppelten Anti-rabbit-Antikörper (Dako) nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt und mit Diaminobenzidine als Substrat entwickelt.

2.6.2 Elektronenmikroskopie

Aus der Leber wurden 1mm breite Stücke über Nacht in 2,5% Glutaraldehyd in 100mM Cacodylate Puffer pH 7,3 fixiert, dann nochmals für 2Std. in 2% OsO₄ nachfixiert, dehydriert und in Araldite 502 eingebettet. Die angefertigten Ultra Dünnschnitte wurden auf 200-mesh „grids“ aufgezogen und mit 1% Uranylacetat und Bleicitrat für 30Min. gefärbt. Die ultrastrukturellen Bilder wurden mittels eines EM-10 Elektronenmikroskops gefertigt.

2.7 Adenovirenproduktion

HEK 293 Zellen wurden in 15 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 80% in Zelllinien-Medium kultiviert und mit $1-2 \times 10^8$ PFU/Schale des jeweiligen Adenovirus infiziert. Die Schalen wurden dann für 48Std. bei 37°C inkubiert. Durch seitliches Klopfen an die Schalen wurden die Zellen abgelöst und bei 1500rpm bei 4°C für 10Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 0,5ml/Schale 10mM Tris/HCl, pH 7,8, 20mM MgCl₂ resuspendiert. Um das Virus aus den Zellen zu befreien wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Dies wurde dreimal wiederholt und anschließend die Zellsuspension bei 4000Upm für 5Min. bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand nochmals bei 4000Upm, für 10Min. bei 4°C zentrifugiert und die Viruslösung zur Ultrazentrifugation eingesetzt.

Ultrazentrifugation

Jeweils 2,5ml Cäsiumchlorid 1,25 wurden in 2 Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und mit 2,5ml CsCl 1,4 unterschichtet. Dann wurden 6ml der Viruslösung langsam auf den

CsCl-Gradienten pipettiert und mit 10mM Tris/HCl, pH 7,8, 20mM MgCl₂ ausgewogen. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden in die dafür vorgesehenen Rotorbehälter eingesetzt und die Ultrazentrifuge gestartet (35000Upm, 60Min., 10°C).

Die untere weiß-bläuliche Virusbande wurde mit einer Kanüle punktiert und abgesaugt. In jeweils 2 neue Ultrazentrifugenröhrchen wurden jeweils 8ml CsCl 1.34 pipettiert und die Viruslösung der ersten Zentrifugation auf die Röhrchen verteilt, mit 10mM Tris/HCl pH 7,8, 20mM MgCl₂ ausgewogen und zentrifugiert (30000Upm, 18Std., 10°C). Die untere weiß-bläuliche Virusbande wurde wieder mit einer Kanüle punktiert und abgesaugt.

Dialyse

Die Viruslösung wurde nach Angaben des Herstellers in die Dialyse-Kammer gespritzt und in den Dialyse-Puffer gelegt. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für 4Std., wobei einmal stündlich der Puffer durch frischen ersetzt wurde. Die Viruslösung wurde mit einer Spritze aus der Dialysekammer gezogen und bei – 80°C eingefroren.

Virustitration

Hierfür wurden $2,5 \times 10^5$ HEK 293 Zellen in 1ml Zelllinienmedium in eine 12-Loch Platte für 18-24Std. bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Dann wurde eine Verdünnungsreihe des zu bestimmenden Virus hergestellt. Dabei wurden in die obere Reihe 30µl, 10µl, 3µl, 1µl der 12-Loch-Platte zu jeweils 1ml Medium pipettiert. Dann wurden je 10µl aus dem jeweiligen Loch der oberen Reihe in das Loch der mittleren Reihe pipettiert. Dies entspricht dann 0,3µl, 0,1µl, 0,03µl und 0,01µl.

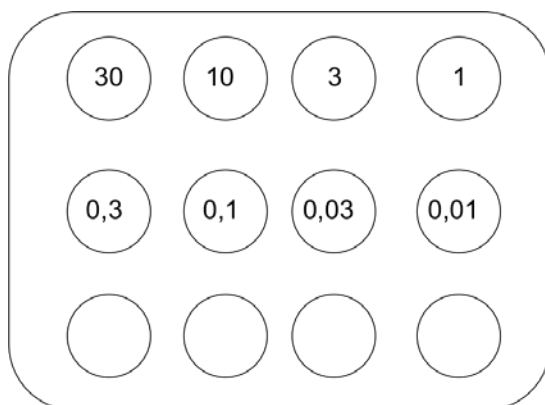


Abb. III.2 Virustitration in einer 12-Loch Platte

Nach 48Std. wurde die Konzentration zur Berechnung eingesetzt, bei der sich noch alle Zellen abgelöst haben. Mit Hilfe der Tabelle lässt sich die Viruskonzentration der titrierten Viruslösung ablesen.

Menge der Viruslösung	Viruskonzentration
30 µl	$1,7 \times 10^8$ IU/ml
10 µl	5×10^8 IU/ml
3 µl	$1,7 \times 10^9$ IU/ml
1 µl	5×10^9 IU/ml
0,3 µl	$1,7 \times 10^{10}$ IU/ml
0,1 µl	5×10^{10} IU/ml
0,03 µl	$1,7 \times 10^{11}$ IU/ml
0,01µl	5×10^{11} IU/ml

2.8 *In vivo* Biolumineszenz

Biolumineszenz entsteht wenn das Enzym Luziferase mit dem Substrat Luziferin in Anwesenheit von Sauerstoff umgesetzt und so Photonen freisetzt. Diese Photonen können durch eine CCD (cooled charge-coupled device) Kamera sichtbar gemacht werden. Die Viruslast nach experimenteller Infektion mit Adenoviren, welche Luziferase unter einem CMV-Promoter exprimieren, wurde mit dem IVIS Imaging System 200 bestimmt. Die Luziferase wird hier von dem Adenovirus AdOVA exprimiert. C57Bl/6-Mäuse wurden 24Std. vor der Messung intravenös mit 5×10^6 PFU AdOVA infiziert. Zur Quantifizierung wurde den Mäusen dann 2,5mg Luziferin intraperitoneal injiziert und nach 5Min. unter Inhalationsnarkose mit Isofluran die *in vivo*-Biolumineszenz detektiert.

2.9 Generierung von Knochenmarkschimären

Es wurden drei verschiedene Knochenmarkschimären generiert. DBA/2 Knochenmark in Tie-2Kb Mäuse (DBA/2 -> Tie-2Kb); Tie-2Kb Knochenmark in DBA/2 Mäuse (Tie-2Kb^b -> DBA/2); DBA/2 Knochenmark in DBA/2 Mäuse (DBA/2 -> DBA/2).

Die Empfängertiere wurden jeweils mit einer Dosis von 9 Gy (= 900Rad) in einer Gammabestrahlungsanlage bestrahlt. Am darauf folgenden Tag wurde von den jeweiligen Spendertieren das Knochenmark aus Femur und Tibia entnommen und

danach wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen intravenös (i.v.) in die Empfängertiere injiziert. Nach ca. 6-8 Wochen wurde die erfolgte Rekonstitution in den Empfängertieren analysiert, indem Blut mit einem H-2K^b-spezifischen Antikörper gefärbt wurde. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer.

2.10 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt. Bei den *in vivo* Versuchen bestanden die Gruppen aus 3-5 Tieren. Die Fehlerabweichung wurde als Standardabweichung des Mittelwertes (SD) angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels dem zweiseitigen Student's t-Test mit Hilfe des Programms Prism4 (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung transgener Mäuse mit zelltyp-spezifischer Expression des MHC Klasse I-Moleküls H-2K^b

Die Leber erfüllt neben den metabolischen auch wichtige immunregulatorische Aufgaben. Dabei spielt die Antigenpräsentation eine zentrale Rolle. Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss die direkte Antigenpräsentation von infizierten Hepatozyten, im Vergleich zur Kreuzpräsentation von LSEC, auf die Entstehung einer Hepatitis hat. Zur Identifikation der an der Antigenpräsentation beteiligten Zellen wurden genetisch definierte Mäuse verwendet, welche durch eine zelltyp-spezifische Expression des MHC Klasse I-Moleküls H-2K^b charakterisiert sind. C57Bl/6 Mäuse besitzen eine ubiquitäre Expression des MHC I Haplotyps H-2K^b. Das SIINFEKL-Peptid ist das dominante Epitop von OVA im Kontext von H-2K^b. Die DBA/2 Mäuse hingegen besitzen statt dem H-2K^b den MHC I Haplotyp H-2K^d und sind somit nicht in der Lage, die H-2K^b-restringierten OT-I T-Zellen zu stimulieren. Tie2-K^b Mäuse tragen das MHC I Molekül H-2K^b nur auf Endothelzellen, da Tie2 ein endothel-spezifischer Promoter darstellt. Bei diesen Tie2-K^b Mäusen können somit nur Endothelzellen das relevante MHC I-Molekül exprimieren. Bei CRP-K^b Mäusen beschränkt sich hingegen die H-2K^b Expression auf Hepatozyten, da hier dem H-2K^b der hepatozytenspezifische CRP (C-reaktives Protein) Promoter vorgeschaltet ist (Abb. IV. 1 a)

Mittels einer Antikörperfärbung von H-2K^b und einer durchflusszytometrischen Analyse von isolierten Hepatozyten und LSEC aus C57Bl/6, DBA/2, Tie2-K^b und CRP-K^b konnte bestätigt werden, dass in Tie2-K^b Mäusen nur LSEC und keine Hepatozyten das H-2K^b exprimieren (Abb. IV.1 b). Die Analyse der H-2K^b Expression in CRP-K^b Mäusen ergab, dass nur Hepatozyten und nicht LSEC das H-2K^b tragen. Außerdem erfolgte zusätzlich eine H-2K^b Färbung von isolierten Kupffer Zellen. Dies ergab, dass auch Kupffer Zellen aus Tie2-K^b Mäusen H-2K^b exprimieren (Abb IV.1 b).

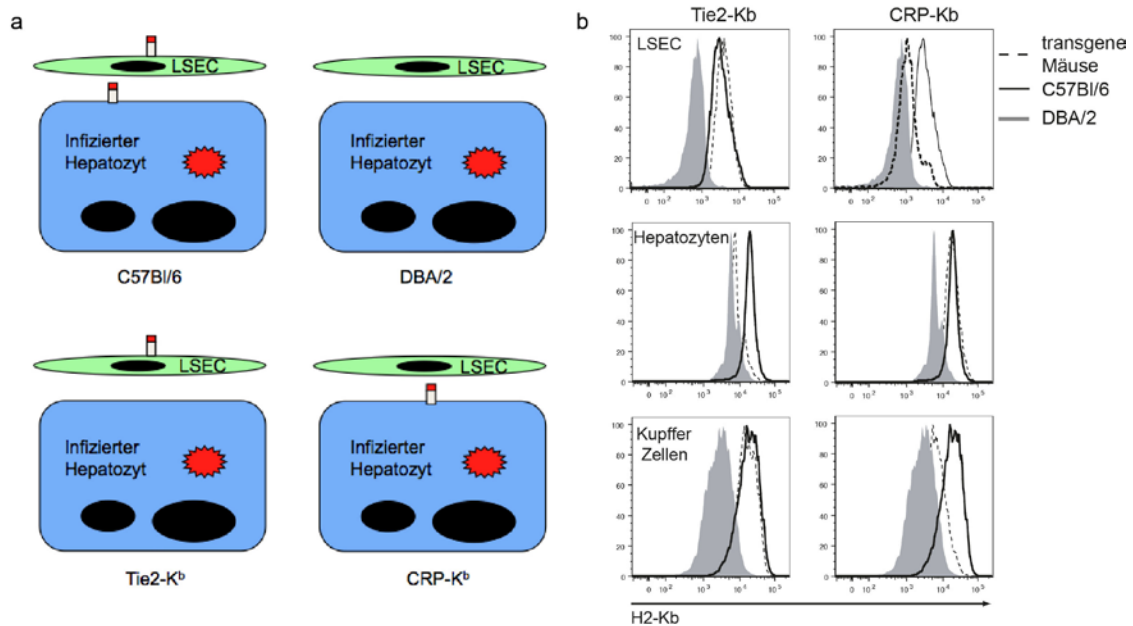


Abb. IV.1 Charakterisierung transgener Mäuse

(a) Modell der K^b Expression von C57Bl/6, DBA/2, Tie2-K^b und CRP-K^b Mäusen. (b) Hepatozyten, LSEC und Kupffer Zellen wurden aus C57Bl/6, DBA/2, Tie2-K^b und CRP-K^b Mäusen isoliert, mit einem H-2K^b Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

2. Etablierung eines *in vivo* Modells für virale Hepatitis

Die komplexe Struktur der Leber und die Interaktion von Immunzellen mit den unterschiedlichen Zellpopulationen der Leber können *in vitro* nicht ausreichend nachgestellt und somit untersucht werden. Um untersuchen zu können welche Mechanismen tatsächlich bei einer Virusinfektion der Leber zur Entstehung eines Leberschadens führen, wurde ein virales *in vivo* Hepatitismodell etabliert. Dabei wurden Mäuse mit replikationsdefizienten rekombinanten Adenoviren des Serotyps 5 infiziert. Das hier verwendete AdOVA exprimiert Ovalbumin (OVA), GFP und Luziferase als Fusionsprotein unter der Kontrolle eines CMV Promoters. Dabei dient das OVA als Modellantigen, das GFP zur Identifikation infizierter Zellen z.B. in histologischen Schnitten und mit der Luziferase kann mittels Biolumineszenz die Viruslast direkt *in vivo* gemessen werden. Als Negativkontrolle dient das AdGFP, welches GFP und Luziferase unter einem CMV Promoter exprimiert. Zwei Tage nach der AdOVA/AdGFP Infektion wurden OVA-spezifische zytotoxische Effektor T Zellen (OT-I) i.v. gespritzt (Abb. IV.2 a). Es ist bekannt, dass zytotoxische T Zellen eine zentrale Rolle in der Entstehung einer viralen Hepatitis spielen (Ando et al., 1994; Maini et al., 2000). Diese zytotoxischen T Zellen wurden *in vitro* mit OVA für 5 Tage

aktiviert und besitzen bereits Effektorfunktionen. Mittels der Messung der Alanin-Aminotransferase (ALT), die spezifisch nur in Hepatozyten vorkommt, kann eine direkte Zerstörung von Hepatozyten nachgewiesen werden und so eine Aussage über das Ausmaß der Hepatitis gemacht werden. AdOVA infizierte Mäuse zeigen zwei Tage nach Gabe der zytotoxischen T Zellen erhöhte ALT-Werte im Vergleich zu den Antigen-negativen AdGFP infizierten Mäusen (Abb. IV.2 b). Dieses Modell ermöglicht es eine antigenspezifische, T Zell-vermittelte virale Hepatitis in Mäuse hervorzurufen.

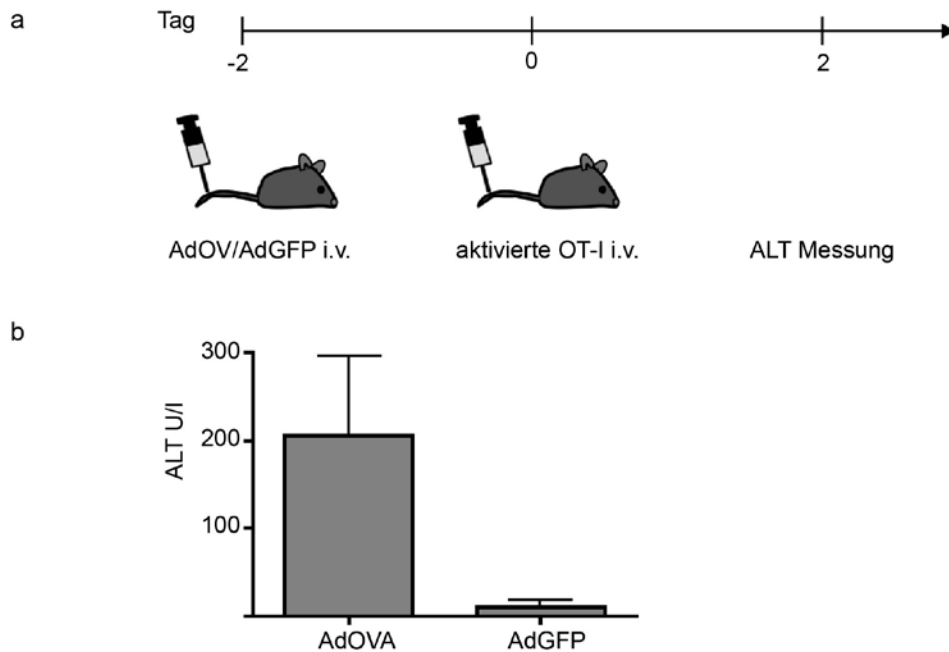


Abb. IV.2 Aktivierte OT-I T Zellen führen zu einer Hepatitis in AdOVA infizierten Mäusen

(a) Schematische Darstellung des viralen Hepatitismodells. (b) C57Bl/6 Mäuse wurden mit AdOVA/AdGFP (2×10^8 PFU) infiziert und nach zwei Tagen wurden 1×10^7 aktivierte OT-I T Zellen i.v. gespritzt. zwei Tage später wurde im Serum die ALT bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3. Adenoviren infizieren bevorzugt die Leber, wobei nur Hepatozyten und keine LSEC infiziert werden

Rekombinante Adenoviren besitzen nach intravenöser Injektion einen natürlichen Hepatotropismus und sind somit ein geeignetes Mittel um die Leber zu infizieren. Es ist für Adenoviren beschrieben, dass sie *in vivo* effektiv Hepatozyten infizieren können (Stratford-Perricaudet et al., 1990; Li et al., 1993). Mittels der *in vivo* Biolumineszenz-Methode konnte bestätigt werden, dass nach einer Adenovirus-Infektion vor allem die

Leber infiziert wurde (Abb. IV.3 a). Dabei wurde den Mäusen AdOVA in die Schwanzvene (i.v.) injiziert und nach zwei Tagen Luziferin intraperitoneal (i.p.) appliziert, um dann die Biolumineszenz mittels eines IVIS2000 Systems messen zu können.

Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) werden jedoch durch Adenovirus nicht infiziert (Hegenbarth et al., 2000). In einer Kokultur aus Hepatozyten und LSEC konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten mit AdGFP infiziert wurden (grün), im Gegensatz zu LSEC (rot), die keine GFP-Expression zeigen und somit nicht infiziert wurden (Abb. IV.3 b). Dies konnte bestätigt werden, indem Hepatozyten und LSEC aus AdGFP infizierten Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert wurden (Abb. IV.3 c).

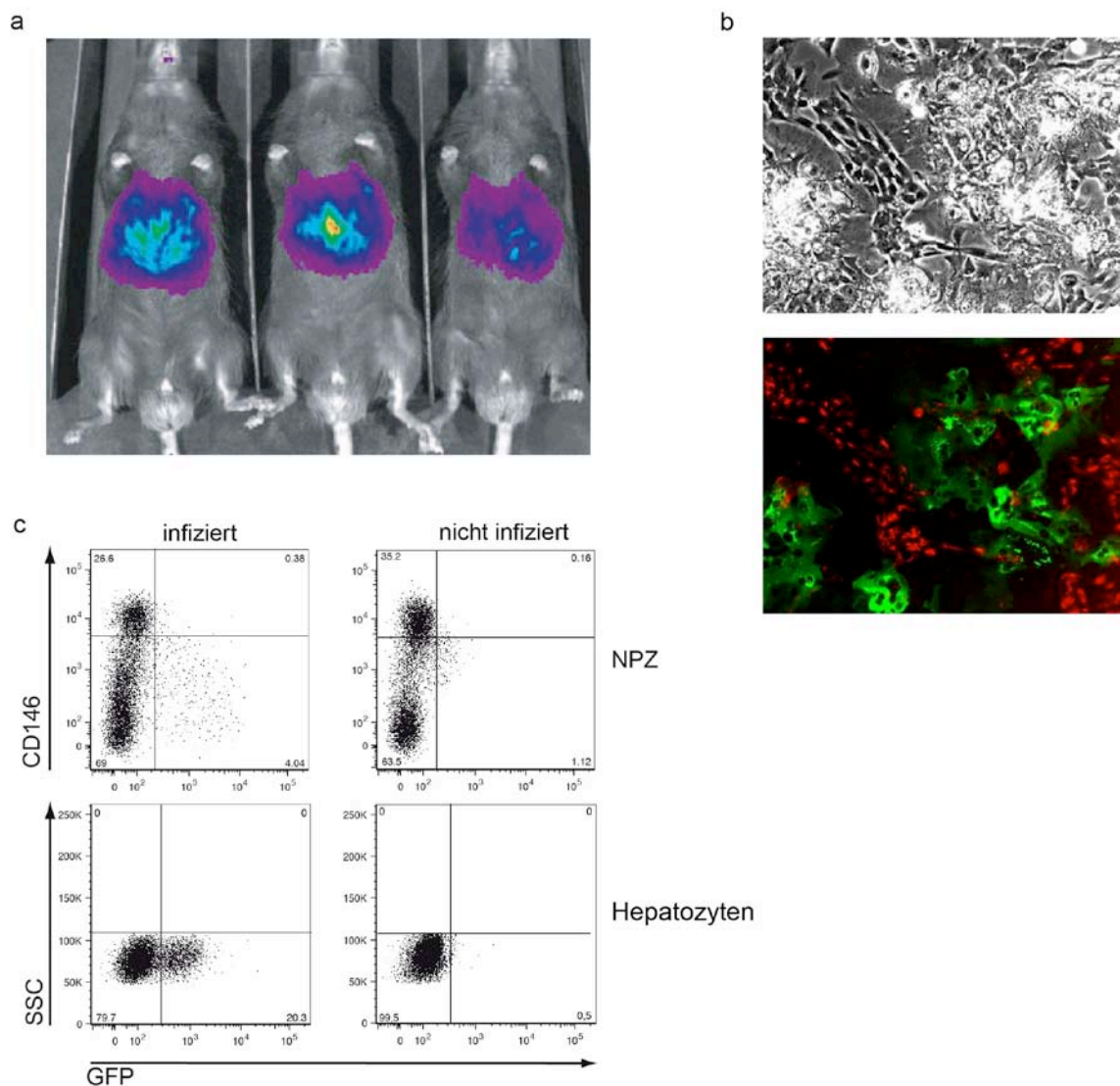


Abb. IV.3 Adenovirus infiziert nur Hepatozyten und keine LSEC

(a) C57Bl/6 Mäuse wurden mit einem rekombinanten Adenovirus (AdOVA) i.v. infiziert (10^6 PFU/Maus), der Ovalbumin (OVA), GFP und Luziferase unter der Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Zwei

Tage später wurde die Biolumineszenz nach Luziferininjektion (i.p.) mittels eines IVIS200 Systems gemessen. **(b)** Kokultur aus Hepatozyten und LSEC ein Tag nach AdGFP Infektion. Oben: Durchlichtmikroskopie, unten: Fluoreszenzmikroskopie. LSEC wurden hierbei durch Aufnahme von Alexa647 gekoppeltem OVA (rot) sichtbar gemacht. Infizierte Hepatozyten grün. **(c)** C57Bl/6 Mäuse wurden mit AdGFP (2×10^8 PFU) infiziert. Nach 48Std. wurden Hepatozyten und LSEC mittels Kollagenaseperfusion aufgereinigt und durchflusszytometrisch auf GFP Expression analysiert. LSEC wurden mittels CD146 Antikörper identifiziert. **(a-c)** Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

4. Kreuzpräsentation viraler Antigene durch LSEC

LSEC können sehr effektiv lösliche Antigene aus dem Blut aufnehmen und diese CD8 T Zellen kreuzpräsentieren (Limmer et al., 2000, 2005; Diehl et al., 2008; Schurich et al., 2009). Es stellte sich die Frage, ob LSEC auch virale Antigene kreuzpräsentieren können, die von infizierten Hepatozyten stammen. Um dies zu beantworten wurde eine humane Hepatozytenzelllinie (HepG2) mit AdOVA oder AdGFP infiziert und mit LSEC kokultiviert. Als Reporter für die Kreuzpräsentation wurden über Nacht in diese Kokultur die T Zelllinie B3Z zugegeben, welche SIINFEKL im Kontext von H-2K^b erkennt. B3Z sind in der Lage, nach Stimulation Interleukin-2 (IL-2) zu produzieren und in den Überstand zu sezernieren. Da es sich bei der HepG2 Zelllinie um humane Zellen handelt, besitzen diese kein murines H-2K^b. Deshalb war bei AdOVA infizierten HepG2 (HepG2+AdOVA) keine B3Z-Stimulation und somit keine IL-2 Sekretion vorhanden. Da LSEC, wie schon gezeigt, nicht mit Adenovirus infiziert werden (Abb. IV.3 c), konnte auch eine direkte Präsentation ausgeschlossen werden (Abb. IV.4 a LSEC + AdOVA). Dagegen konnte bestätigt werden, dass LSEC virales Antigen (hier SIINFEKL) von AdOVA infizierten HepG2 kreuzpräsentieren können (Abb. IV.4 a LSEC + HepG2 + AdOVA). Kreuzpräsentation von LSEC fand dabei auch statt, wenn nur der Überstand AdOVA infizierter HepG2 mit LSEC inkubiert wurde (Abb. IV.4 a LSEC + Überstand AdOVA infizierter HepG2).

Um zu untersuchen, ob LSEC auch in vivo aufgenommenes virales Antigen von Hepatozyten kreuzpräsentieren, wurden LSEC aus AdOVA oder AdGFP infizierten C57Bl/6, CRP-K^b oder Tie2-K^b Mäusen isoliert und mit B3Z kokultiviert. Wie bereits beschrieben, sind in Tie2-K^b Mäusen nur die LSEC zur H-2K^b Expression fähig, dagegen exprimieren in CRP-K^b Mäusen allein die Hepatozyten das H-2K^b (Abb. IV.1 a, b).

Die Kreuzpräsentation ist dabei in den AdOVA infizierten C57Bl/6 Mäusen und in den Tie2-K^b Mäusen in vergleichbarem Maße vorhanden (Abb. IV.4 b). Da LSEC aus CRP-

K^b infizierten Mäusen keine B3Z-Stimulation aufwiesen, konnte hiermit ausgeschlossen werden, dass das komplette peptidbeladene MHC I-Molekül von Hepatozyten auf LSEC transferiert wurde. Zusammenfassend konnte der Nachweis erbracht werden, dass LSEC *in vitro* und *in vivo* aufgenommenes virales Antigen, welches von infizierten Hepatozyten stammt, kreuzpräsentieren können.

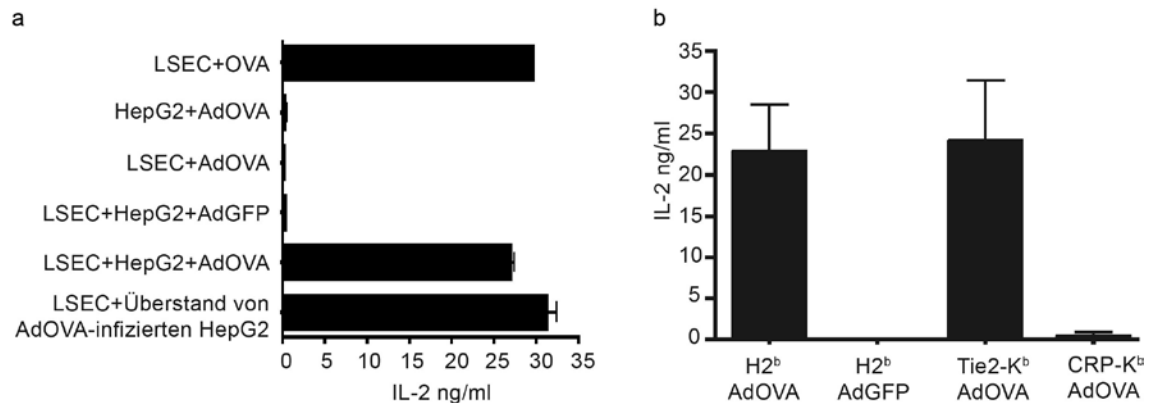


Abb. IV.4 LSEC kreuzpräsentieren virales Antigen von Hepatozyten

(a) Eine Kokultur aus LSEC und HepG2 wurde mit AdOVA oder AdGFP infiziert (MOI 25) oder nur der Überstand von infizierten Hepatozyten mit LSEC inkubiert. Als Positivkontrolle wurden LSEC mit OVA (0,5 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden über Nacht B3Z zur Kultur zugegeben und am nächsten Tag IL-2 im Überstand mittels ELISA bestimmt. **(b)** C57Bl/6 Mäuse wurden mit AdOVA/AdGFP (2×10^8 PFU) infiziert und nach zwei Tagen wurden die LSEC mittels Kollagenaseperfusion aufgereinigt. Die LSEC wurden dann über Nacht mit B3Z kokultiviert und im Überstand IL-2 mittels ELISA bestimmt. **(a, b)** Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

5. Konsequenzen der Kreuzpräsentation viraler Antigene für die Entwicklung einer Hepatitis

Es wird angenommen, dass virale Infektionen der Leber mit z.B. Hepatitis B oder C Virus nur durch direkten Kontakt von zytotoxischen T Zellen mit den infizierten Hepatozyten kontrolliert werden können (Guidotti et al. 2001; Rehmann et al., 2005). Es ist auch für zytotoxische T Zellen beschrieben, dass sie über die Fenestrae der LSEC direkten Kontakt mit Hepatozyten aufzunehmen können (Warren et al., 2006). Durch die mikrovaskulären Strukturen in der Leber ergibt sich jedoch, dass ein Kontakt von zytotoxischen T Zellen mit ebenfalls antigenpräsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen, Kupffer Zellen und LSEC viel wahrscheinlicher ist.

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss die zell-spezifische Antigenpräsentation auf die Hepatitisinduktion besitzt.

Hierfür wurden die bereits beschriebenen transgenen Mäuse (Tie2-K^b, CRP-K^b) und Wildtyp-Mäuse (C57Bl/6) mit AdOVA oder AdGFP infiziert und anschließend wurden aktivierte OT-I T Zellen transferiert. Hierbei zeigten C57Bl/6 Mäuse, die eine ubiquitäre H-2K^b Expression besitzen, eine antigen-spezifische Hepatitisinduktion. Wenn nur Hepatozyten virales Antigen präsentieren können, wie es in CRP-K^b Mäusen der Fall ist, zeigte sich überraschenderweise eine signifikante Reduktion der Hepatitis im Vergleich zu den Wildtyp C57Bl/6 Mäusen (Abb. IV.5 a). Auch die Leberhistologie zeigte eine geringere Lymphozytenakkumulation und einen weniger ausgeprägten Leberschaden als in den C57Bl/6 Mäusen (Abb. IV.5 b). Dies deutet darauf hin, dass die alleinige Antigenpräsentation von Hepatozyten nicht so effektiv ist wie in C57Bl/6 Tieren. Es müssen noch andere APC zur Antigenpräsentation und der damit verbundenen Hepatitis-Entstehung beitragen. CD 8 positive Dendritische Zellen sind bekannt für ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation (den Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001). Auch Makrophagen können exogen aufgenommenes Antigen an CD 8 T Zellen präsentieren (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993). Wenn jedoch Makrophagen durch Clodronatliposomen und DCs durch Diphtheria Toxin in CD11c DTR Mäusen depletiert wurden, führte dies nur zu einer geringen Reduktion der ALT, was dafür spricht, dass diese Zellpopulationen keine entscheidende Rolle in der Hepatitisinduktion spielen. Wie bereits gezeigt wurde sind LSEC in der Lage, virales Antigen, welches von infizierten Hepatozyten stammt, *in vitro* und *in vivo* kreuzzupräsentieren (Abb. IV.4 a, b). Es stellte sich nun die Frage, ob diese Kreuzpräsentation auch *in vivo* relevant ist. Tatsächlich zeigte sich in Tie2-K^b Mäusen, in welchen nur LSEC Antigen kreuzpräsentieren, eine Hepatitisinduktion die mit Wildtypmäusen (C57Bl/6) vergleichbar war (Abb. IV.5 a). Dies wurde ebenfalls durch die Leberhistologie bestätigt, die in Tie2-K^b Mäusen eine verstärkte Lymphozytenansammlung und einen erheblichen Leberschaden sichtbar machte (Abb. IV.5 b). So konnte nachgewiesen werden, dass LSEC virales Antigen, das von infizierten Hepatozyten stammt, an zytotoxische T Zellen kreuzpräsentieren. Dadurch entsteht eine virale Hepatitis, obwohl die zytotoxischen T Zellen die infizierten Hepatozyten nicht direkt erkennen. Dies könnte ein Mechanismus sein, der es erlaubt infizierte Hepatozyten auch ohne direkte MHC I- Erkennung effektiv zu eliminieren.

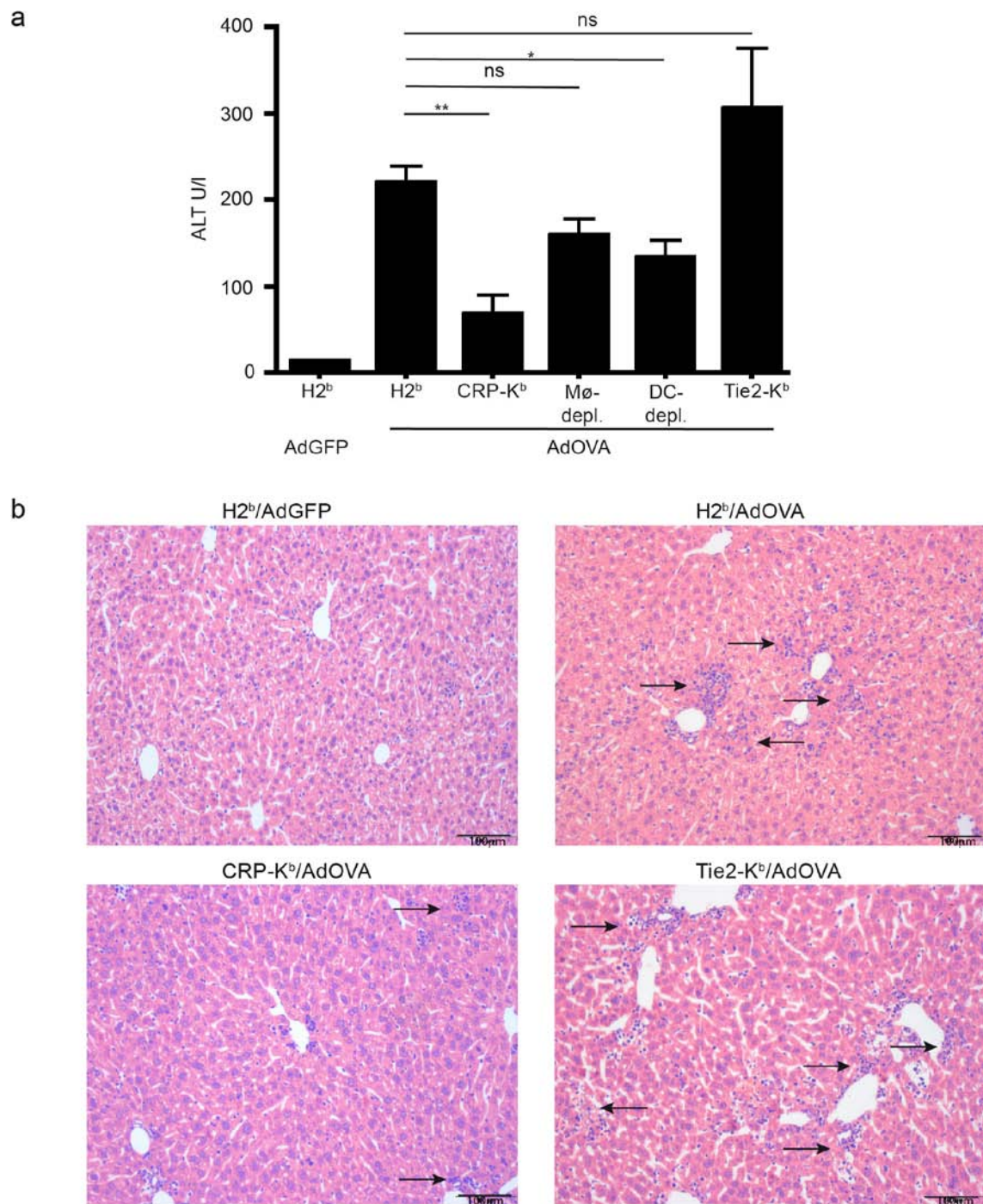


Abb. IV.5 Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Hepatitis

(a) Tie2-K^b, CRP-K^b, CD11c DTR und C57Bl/6 Mäuse wurden mit AdOVA oder AdGFP (2×10^8 PFU) infiziert und zwei Tage später aktivierte OT-I T Zellen (1×10^7) transferiert. Clodronatliposomen (200 μ l/Maus) und Diphtheria Toxin wurden ein Tag nach der Infektion i.v. gespritzt. Die ALT-Messung erfolgte zwei Tage nach dem T Zell Transfer aus dem Serum der Mäuse ($n = 4$ Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. **(b)** Die Hepatitis wurde wie in (a) induziert. Zwei Tage nach dem T Zell Transfer wurden Leberschnitte gefertigt und HE gefärbt. Die Leberschnitte und die HE-Färbung wurden vom Institut für Pathologie der Universität Köln gefertigt.

5.1 Makrophagen und Dendritische Zellen spielen keine Rolle für die Hepatitisinduktion

Die Analyse der transgenen Mäuse deutet darauf hin, dass Tie2-K^b Mäuse bei denen nur LSEC das H-2K^b tragen sollen auch Makrophagen der Leber (Kupffer Zellen) auf ihrer Oberfläche H-2K^b exprimieren. Es ist bekannt, dass Makrophagen effektiv Antigene aus dem Blut aufnehmen können und diese auch an T Zellen präsentieren (Kovacsics-Bankowski et al., 1993). Zusätzlich zeigte sich in dem vorherigen Experiment, dass eine Behandlung der Mäuse mit Clodronat Liposomen zu einer geringen Reduktion der ALT führt. Um Kupffer Zellen für eine Hepatitisinduktion ausschließen zu können, wurden Knochenmarkschimären generiert. Hierfür wurden DBA/2 Mäuse, die kein H-2K^b tragen, bestrahlt und Knochenmark von Tie2-K^b Mäusen injiziert. Hier tragen nur Zellen, die dem Knochenmark entstammen, wie Kupffer Zellen, das H-2K^b. Es zeigte sich kein Anstieg der ALT, was darauf hinweist, dass Makrophagen der Leber keinen Einfluss auf die Hepatitis-Entstehung nehmen (Abb. 7, tie2-K^b->DBA/2). Außerdem wurde DBA/2 Knochenmark in Tie2-K^b Mäuse transferiert. Somit besitzen alle Zellen, die dem Knochenmark entstammen, wie Makrophagen und Dendritische Zellen, kein H-2K^b. Nur LSEC präsentieren hier Antigen an die zytotoxischen T Zellen. Es zeigte sich, dass diese Präsentation genauso effektiv ist in der Fähigkeit eine Hepatitis auszulösen, wie es in den Wildtyp-Mäusen (C57Bl/6) und Tie2-K^b Mäusen der Fall ist (Abb. IV.6, DBA/2->tie2-K^b). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Makrophagen und andere Zellen, die dem Knochenmark entstammen, keinen Einfluss auf die Hepatitisinduktion besitzen und die Kreuzpräsentation von LSEC ausreichend ist um einen Leberschaden hervorzurufen.

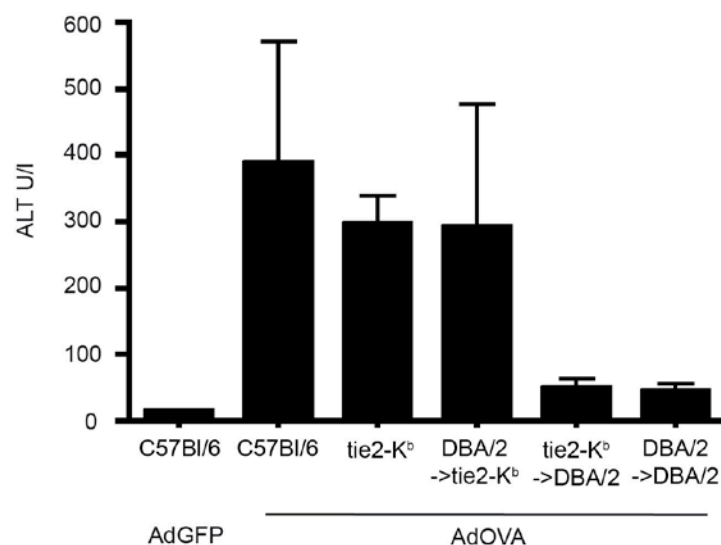


Abb. IV.6 Makrophagen spielen keine Rolle für die Hepatitisinduktion

DBA/2 und Tie2-Kb Mäuse wurden mit 9 Gy bestrahlt. Am folgenden Tag wurde das Knochenmark aus DBA/2 und Tie2-Kb Mäusen isoliert und den jeweiligen Empfängertieren i.v. gespritzt. Nach 7 Wochen wurden die Mäuse mit AdOVA oder AdGFP infiziert (2×10^8 PFU) und zwei Tage später aktivierte OT-I T Zellen transferiert. Die ALT-Messung erfolgte zwei Tage nach dem T Zell-Transfer aus dem Serum der Mäuse.

5.2 Die Kreuzpräsentation von LSEC vermittelt antivirale Immunität

Als nächstes stellte sich die Frage, welchen Einfluss die zelltyp-spezifische Antigenpräsentation nicht nur auf eine Hepatitisinduktion hat, sondern auch auf die Elimination des Virus. Dabei wurden in Leberschnitten mittels immunhistologischer Färbung die Anzahl der infizierten Hepatozyten bestimmt. Die Reduktion infizierter Hepatozyten zeigt dabei die Effizienz der Viruselimination. Tie2-K^b Mäuse zeigten eine Reduktion infizierter Hepatozyten, die mit den Wildtyp Mäusen vergleichbar war (Abb. IV.7 a). Dies deutet darauf hin, dass die Antigenpräsentation auf LSEC ausreicht um eine effektive Viruselimination zu erlangen. Im Vergleich dazu, ist in den Leberschnitten von CRP-K^b Mäusen eine größere Anzahl an virusinfizierten Hepatozyten zu finden. Eine ausschließliche Antigenpräsentation auf Hepatozyten scheint ineffizienter in Bezug auf die Viruselimination zu sein.

Zusätzlich konnte dies mit Hilfe der *in vivo* Biolumineszenz-Messung in Echtzeit bestätigt werden. Dabei korreliert die gemessene Biolumineszenz (Virusexpression von Luziferase) direkt mit der Anzahl infizierter Hepatozyten (Stabenow et al., 2010). In Tie2-K^b Mäusen konnten die zytotoxischen T Zellen die virale Genexpression sofort nach dem CTL-Transfer unter Kontrolle bringen (Abb. IV.7 b). In CRP-K^b Mäusen erfolgte die Kontrolle mit einer Verzögerung von 48Std (Abb. IV.7 b). Infolgedessen konnte gezeigt werden, dass bei alleiniger Antigenpräsentation von Hepatozyten die Viruselimination reduziert und verzögert stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass Kreuzpräsentation in der Lage ist, eine antivirale Immunität in der Leber zu vermitteln, welche schneller ist als die konventionelle Antigenerkennung von infizierten Hepatozyten über MHC I.

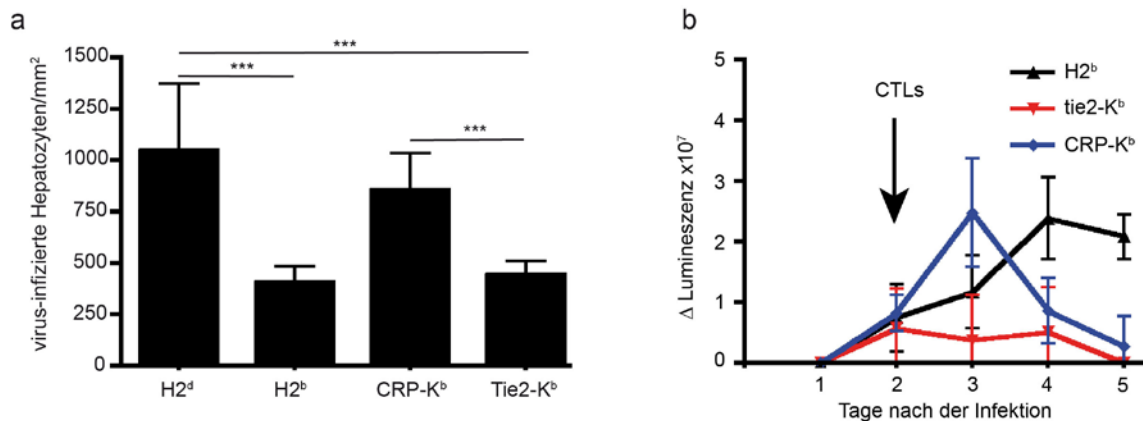


Abb. IV.7 Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Viruselimination

(a) DBA/2 (H2^d), C57Bl/6 (H2^b) Tie2-K^b, CRP-K^b, Mäuse wurden mit AdOVA oder AdGFP (2×10^8 PFU) infiziert und zwei Tage später aktivierte OT-I T Zellen (1×10^7) transferiert. Zwei Tage nach dem T Zell Transfer wurden Leberschnitte gefertigt und mittels immunhistochemischer GFP-Färbung die Anzahl der infizierten Hepatozyten bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

(b) C57Bl/6 (H2^b), Tie2-K^b, CRP-K^b, Mäuse wurden mit AdOVA (1×10^6 PFU) infiziert und der OT-I T Zell Transfer erfolgte zwei Tage später. Für die Biolumineszenz-Messung wurde den Mäusen 200 µl Luziferin i.p. gespritzt (n = vier Mäuse pro Gruppe).

6. Die Thrombozytenakkumulation beeinflusst nicht die virale Entstehung einer viralen Hepatitis

Eine Zerstörung des Endothels führt in der Regel zum Kontakt von Thrombozyten mit den darunterliegenden Matrixproteinen und infolgedessen zu deren Aktivierung und Thrombusbildung (Wu et al., 1996). Diese können die kleinen Sinusoide der Leber verschließen, was zu einer Unterversorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen führt und deren Untergang bedeutet. Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass in einer Kokultur aus aktivierten OT-I T Zellen und LSEC, welche OVA kreuzpräsentieren, diese eliminiert werden (Abb. IV.8 a). Die Effizienz ist dabei von der Menge der zugegebenen OT-I T Zellen abhängig. Je mehr T Zellen, desto mehr LSEC werden pro Zeiteinheit eliminiert (Abb. IV.8 a). Auch *in vivo* kommt es nach einem adoptiven Transfer von OVA-spezifischen Effektor T Zellen in AdOVA infizierten Mäusen zur Elimination von LSEC, was hier elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde (Abb. IV.8 b, zerstörtes Endothel siehe Stern). Bei der Infektion mit AdGFP bleibt das Endothel intakt (Abb. IV.8 b, siehe Pfeil). Es stellte sich nun die Frage, ob die teilweise Zerstörung des Endothels zu einer Aktivierung und Akkumulation von Thrombozyten führt und dies letztendlich zum Untergang der Hepatozyten beiträgt.

Denn es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Infektion der Leber Thrombozyten aktiviert und so, durch eine gestörte Mikrozirkulation, die virale Hepatitis verstärkte (Iannacone et al., 2005; Lang et al., 2008). Auch in diesem System konnte, nach der Infektion mit AdOVA und dem Transfer der zytotoxischen T Zellen, eine Thrombozyten-Akkumulation (Pfeile) in den Sinusoiden (rot) beobachtet werden (Abb. IV.8 c). Jedoch zeigte eine Behandlung mit einem Thrombozyten-depletierenden Antikörper keinen positiven Effekt auf die Entstehung der viralen Hepatitis (Abb. IV.8 d). Somit spielt die Akkumulation von Thrombozyten, die nach der teilweisen Zerstörung der LSEC auftritt, keine Rolle in der Hepatitis-Entstehung.

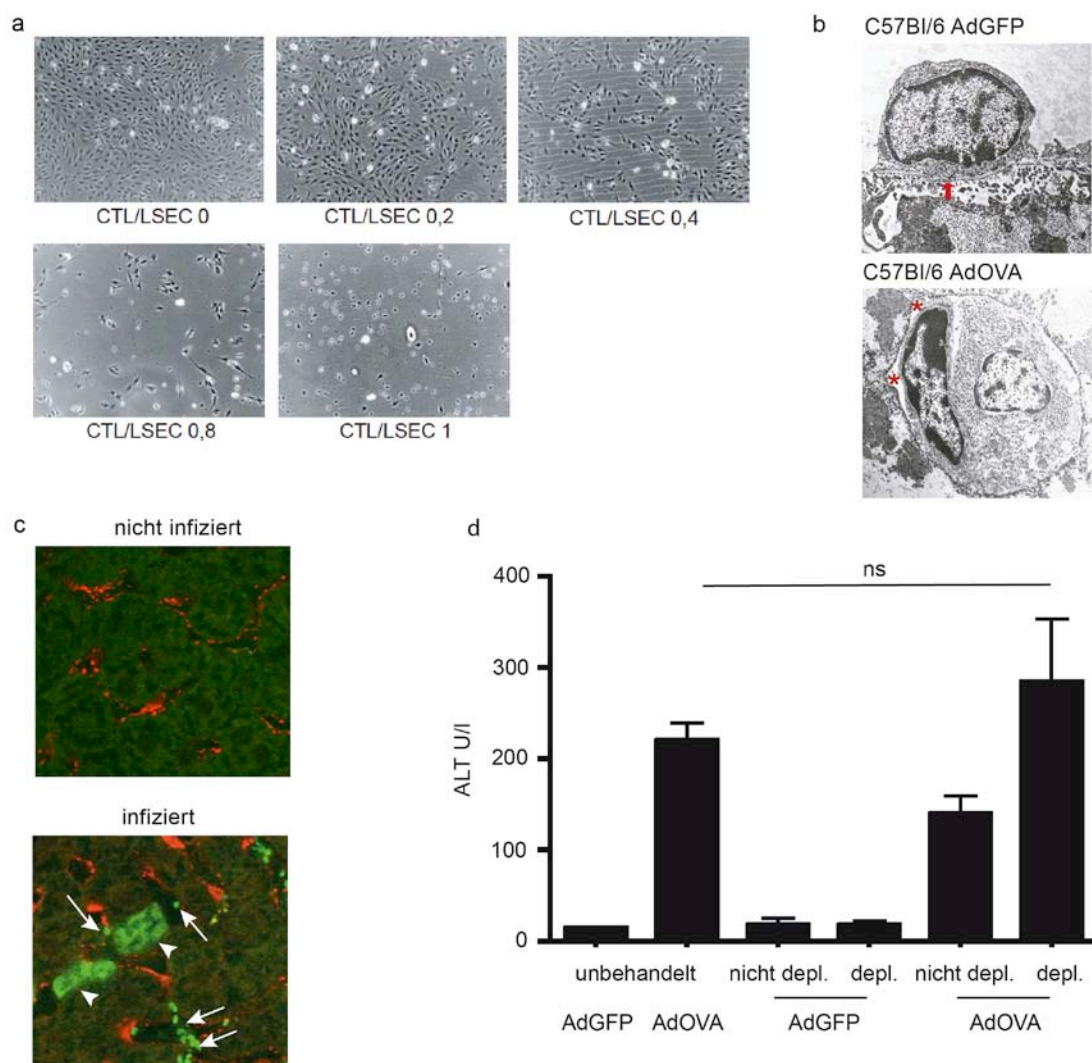


Abb. IV.8 Endothelschaden ist nicht für virale Hepatitis verantwortlich

(a) 1×10^5 LSEC wurden mit 0,5mg/ml OVA für 30Min. inkubiert und dann mit aktivierte OT-I T Zellen (CTL = *engl.* Cytotoxic T Lymphocyte) in steigender Zellzahl (0 = keine CTL, 0,2 = 2×10^4 CTL, 0,4 = 4×10^4 CTL usw.) für 3Std. kokultiviert. (b-c) Mäuse wurden mit AdOVA infiziert und nach 2 Tagen erfolgte der

Transfer von aktivierten OT-I T Zellen (1×10^7). **(b)** Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen das intakte Endothel mit einem Pfeil und das zerstörte Endothel mit zwei Sternen gekennzeichnet. Die Aufnahmen wurden vom Institut für Pathologie der Universität Köln gefertigt. **(c)** Um das sinusoidale Endothel sichtbar zu machen wurde 24Std. später Alexa647 gekoppeltes BSA (rot) gespritzt. Danach wurden Schnitte mit einem 488-gekoppelten Thrombozyten-Antikörper (α GPIIb β , grün) gefärbt (Pfeile). Mittels der GFP-Expression lassen sich infizierten Hepatozyten nachweisen (Pfeilspitze). **(d)** Ein Thrombozyten-depletierender Antikörper (α CD42b) oder ein Kontrollantikörper wurden ein Tag vor und ein Tag nach dem T Zell Transfer gespritzt ($4 \mu\text{g/kg}$). Die ALT-Messung erfolgte zwei Tage nach dem T Zell Transfer aus dem Serum der Mäuse ($n = \text{drei Mäuse pro Gruppe}$). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

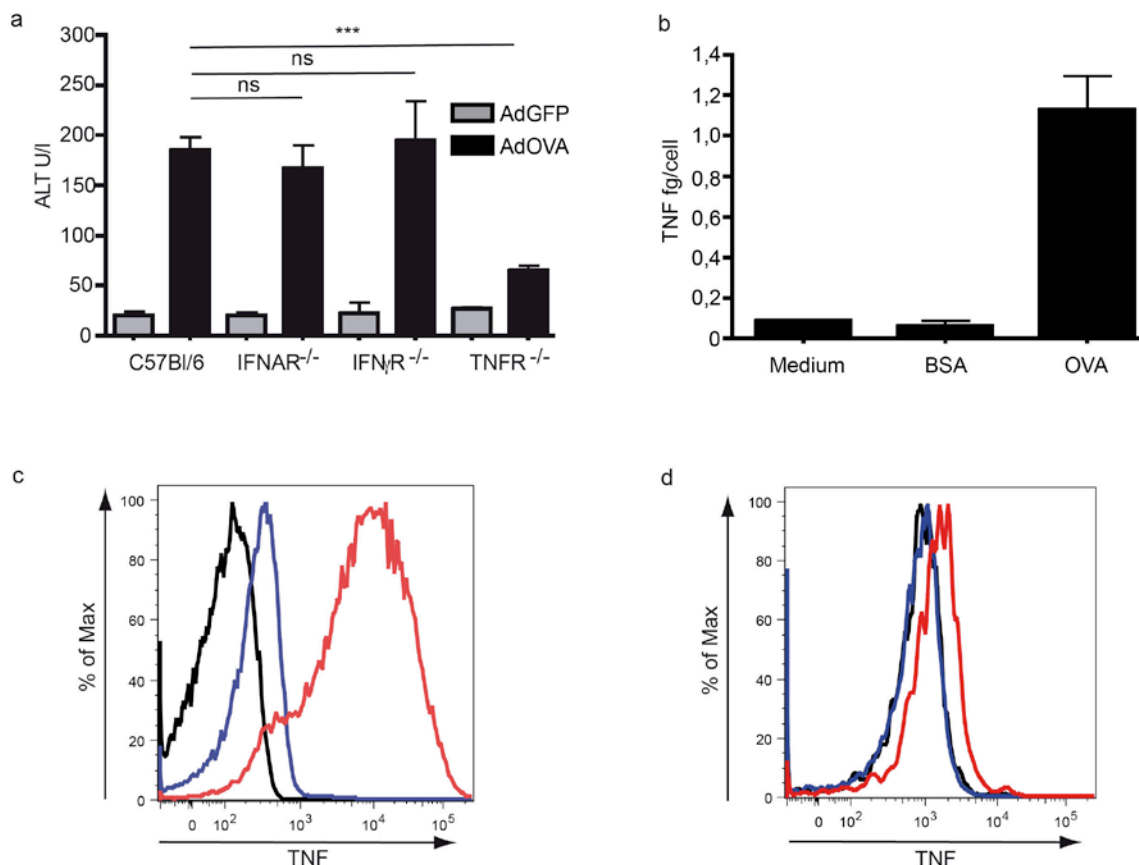
7. TNF von zytotoxischen T Zellen führt bei Infektion zu einer Hepatitis

Da die Akkumulation von Thrombozyten als Grund für die Hepatitis ausgeschlossen werden konnte, war die Frage immer noch unbeantwortet, wie die Hepatozyten sterben ohne eine direkte MHC I-vermittelte Erkennung von zytotoxischen T Zellen.

Hepatozyten, die nicht durch direkten Kontakt mit Effektor T Zellen sterben, könnten durch lösliche Mediatoren eliminiert werden. Typische Moleküle, welche antivirale Aktivität besitzen, sind $\text{IFN}\alpha/\beta$, $\text{IFN}\gamma$ und TNF (Guidotti et al., 1996; Guidotti und Chisari, 2001). Diese werden bei viralen Infektionen vermehrt ausgeschüttet. Wurden $\text{IFN}\alpha$ Rezeptor „knock out“ ($\text{IFNAR}^{-/-}$) und $\text{IFN}\gamma$ Rezeptor „knock out“ ($\text{IFN}\gamma \text{ R}^{-/-}$) Mäuse mit AdOVA infiziert und anschließend aktivierte OT-I adoptiv transferiert, zeigten sich gleiche ALT-Werte wie in Wildtyp C57Bl/6 Mäusen (Abb. IV.9 a). Wurden jedoch TNF-Rezeptor 1+2 „knock out“ ($\text{TNFR1/2}^{-/-}$) Mäuse verwendet, zeigte sich eine erhebliche Reduktion der ALT-Werte und somit der Hepatitis (Abb. IV.9 a). Dies deutet auf eine zentrale Rolle von TNF bei der Entstehung der viralen Hepatitis hin. Es stellt sich die Frage, welche Zellen in diesem System TNF exprimieren und sezernieren. Es ist bekannt, dass zytotoxische T Zellen nach Antigen Erkennung TNF sekretieren (Ratner und Clark, 1997). Das konnte auch hier in einer Ko-Kultur aus OVA kreuzpräsentierenden LSEC und aktivierten OT-I T Zellen gezeigt werden (Abb. IV.9 b). Die TNF-Sekretion ist dabei antigenspezifisch, da BSA keine TNF-Sekretion induzierte (Abb. IV.9 b). Die TNF-Produktion der zytotoxischen T Zellen nach Antigenstimulation durch kreuz-präsentierende LSEC konnte auch zusätzlich *in vitro* mittels einer intrazellulären Färbung nachgewiesen werden (Abb. IV.9 c). Außerdem war es möglich eine TNF-Produktion ex vivo nachzuweisen. Hierfür wurden aktivierte

OT-I T Zellen (CD90.1) 24Std. nach ihrem Transfer in AdOVA oder AdGFP infizierte Mäuse (DBA/2, C57Bl/6) aus den Lebern isoliert und mittels einer intrazellulären Färbung die TNF-Produktion bestimmt.

Um herauszufinden, ob das TNF, das nur von den T Zellen stammt, ausreicht um eine Hepatitis auszulösen, wurden aktivierte OT-I T Zellen, die TNF produzieren können, in $TNF^{-/-}$ Mäuse gespritzt, die kein TNF produzieren können. Es zeigte sich, dass OT-I T Zellen in $TNF^{-/-}$ Mäusen den gleichen Leberschaden hervorrufen wie OT-I T Zellen in TNF kompetenten Mäusen. Zudem wurde durch einen Transfer von aktivierten OT-I T Zellen, die kein TNF produzieren (OT-I $TNF^{-/-}$), in TNF kompetenten Mäusen die Hepatitis um 40% reduziert. Das deutet darauf hin, dass das von den zytotoxischen T Zellen stammende TNF eine wichtige Rolle für die Effektorfunktion dieser Zellen spielt. Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass zytotoxische T Zellen nach Antigenstimulation mit kreuzpräsentierenden LSEC, TNF ausschütten. Dieses TNF ist dann in der Lage, die infizierten Hepatozyten zu eliminieren.



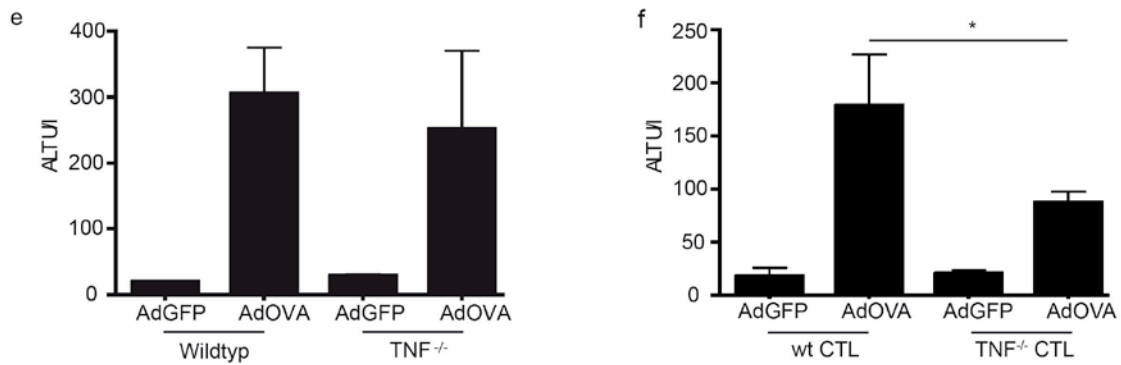


Abb. IV.9 TNF von zytotoxischen T Zellen führt zur Hepatitis

(a) C57Bl/6, IFNAR^{-/-}, IFN γ R^{-/-} und TNFR1+2^{-/-} Mäuse wurden mit 2×10^8 PFU/Maus AdOVA oder AdGFP infiziert, zwei Tage später aktivierte OT-I T Zellen (1×10^7 /Maus) gespritzt und weitere zwei Tage später die ALT aus dem Serum gemessen (n = drei Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (b) LSEC wurden für 15Min. mit BSA oder OVA (0,5mg/ml) inkubiert und dann mit OT-I T Zellen für 18Std. kokultiviert. Das freigesetzte TNF der zytotoxischen T Zellen wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert der TNF-Produktion pro Zelle. (c) LSEC wurden in vitro mit SIINFEKL beladen und mit OT-I T Zellen 4Std. kokultiviert. Dann wurden die OT-I T Zellen für 4Std. mit Monensin und Breveldin A behandelt und anschließend wurde eine intrazelluläre Färbung mittels eines TNF-Antikörpers durchgeführt (schwarz: ohne SIINFEKL; blau: Isotyp; rot: mit SIINFEKL). (d) C57Bl/6 Mäuse wurden mit AdOVA infiziert (1×10^9 PFU/Maus), nach zwei Tagen wurden aktivierten OT-I T Zellen (CD90.1) 24Std. nach ihrem Transfer aus den Lebern isoliert. Um den Proteintransport zu stoppen wurden die Zellen mit Monensin und Breveldin A für 5Std. inkubiert und anschließend eine intrazelluläre TNF-Färbung durchgeführt. (schwarz: DBA/2 AdOVA; blau: C57Bl/6 AdGFP; rot: C57Bl/6 AdOVA). (e, f) Wildtyp (C57Bl/6) und TNF^{-/-} Mäuse wurden mit AdOVA infiziert (2×10^8 PFU/Maus). Die ALT-Messung erfolgte zwei Tage nach dem Transfer von TNF-kompetenten oder TNF^{-/-} aktivierten OT-I T Zellen (n = 4 Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

8. Die virale Infektion ist Voraussetzung für den TNF-vermittelten Tod von Hepatozyten

TNF spielt offensichtlich bei der Entstehung einer viralen Hepatitis eine zentrale Rolle. Das TNF wird von den zytotoxischen T Zellen produziert, wenn diese ihr Antigen über die Kreuzpräsentation von LSEC erkannt haben (Abb. IV.8 b). Folglich stellte sich die Frage, ob die Kreuzpräsentation durch LSEC und die anschließende TNF-Ausschüttung ausreichend sind, um eine Hepatitis auszulösen. Hierfür wurde den Mäusen lösliches OVA oder als Kontrollantigen BSA gespritzt und 30Min. später aktivierte OT-I T Zellen injiziert. Es stellte sich heraus, dass die Kreuzpräsentation von

OVA alleine nicht für eine Hepatitis-Entstehung ausreicht, auch wenn zusätzlich noch TNF injiziert wurde (Abb. IV.10 a). Daraus kann geschlossen werden, dass die Kreuzpräsentation von LSEC und die daraus resultierende TNF-Produktion von zytotoxischen T Zellen für die Entstehung der Hepatitis unerlässlich, aber nicht ausreichend ist. Die virale Infektion muss deshalb ein entscheidender Faktor sein.

Um die Rolle der viralen Infektion bei der TNF-vermittelten Hepatitis genauer zu untersuchen, wurde ein vereinfachtes Modell entwickelt. Dabei wurden C57Bl/6 Mäuse mit AdOVA oder PBS infiziert und zwei Tage später mit TNF oder PBS behandelt. 4Std. später wurde der Leberschaden mittels ALT-Messung bestimmt. Es konnte hierbei nochmal bestätigt werden, dass TNF ohne eine Infektion keinen Leberschaden verursacht (Abb. IV.10 b). Auch die Infektion alleine ist ohne die TNF-Applikation nicht leberschädigend (Abb. IV.10 b). Eine Hepatitis entstand nur, wenn die Mäuse mit AdOVA infiziert waren und zusätzlich TNF gespritzt wurde (Abb. IV.10 b). Dabei scheint die virale Genexpression von Bedeutung zu sein, denn die Infektion mit einem durch UV-Strahlung abgetöteten Virus führte auch nach der TNF-Behandlung zu keinem ALT-Anstieg (Abb. IV.10 b). Wie bereits erwähnt ist der hier verwendete Adenovirus replikationsdefizient. Es stellte sich nun die Frage, ob dieser Sensibilisierungsmechanismus der Infektion gegenüber TNF für Adenoviren spezifisch ist oder auch mit einem replikationskompetenten RNA-Virus möglich ist. Hierfür wurden Mäuse mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) infiziert und zwei Tage später mit TNF behandelt. Dabei bestätigte sich, dass auch die Infektion mit einem replikationskompetenten RNA-Virus die Hepatozyten für den TNF-vermittelten Zelltod sensibilisieren (Abb. IV.10 c). Außerdem konnte in einem „Plaque Assay“ gezeigt werden, dass nach TNF-Injektion die Viruslast im Serum stark reduziert wurde (Abb. IV.10 d). Zusammenfassend lässt dies den Schluss zu, dass die Infektion mit Adenovirus oder LCMV eine Sensibilisierung der Hepatozyten für die TNF-vermittelte Hepatitis bedeutet.

Pathogene Strukturen, wie z.B. virale DNA, werden über sogenannte „Pattern-Recognition“-Rezeptoren (PRR), zu denen die „Toll-like“ Rezeptoren (TLRs) gehören, erkannt (Janeway und Medzhitov, 2002). Hepatozyten exprimieren die mRNA aller TLRs (Liu et al., 2002; Nishimura und Naito, 2005). Durch die Erkennung der viralen Nukleinsäuren könnten die Hepatozyten für das TNF sensitiv gemacht werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Mäuse mit den jeweiligen Liganden zur Stimulation von TLR-3, TLR-4, TLR-9 und intrazellulären Rezeptoren gespritzt und mit TNF behandelt. Dabei stellte sich heraus, dass kein TLR-Ligand in der Lage war, im Zusammenspiel mit TNF, eine Hepatitis auszulösen (Abb. IV.10 e). Die TLR-Stimulation war also nicht ausreichend, um die Hepatozyten mit TNF zu töten. Es muss

noch ein zusätzlicher Faktor im infizierten Hepatozyten dazu führen, dass er für TNF empfindlich wird.

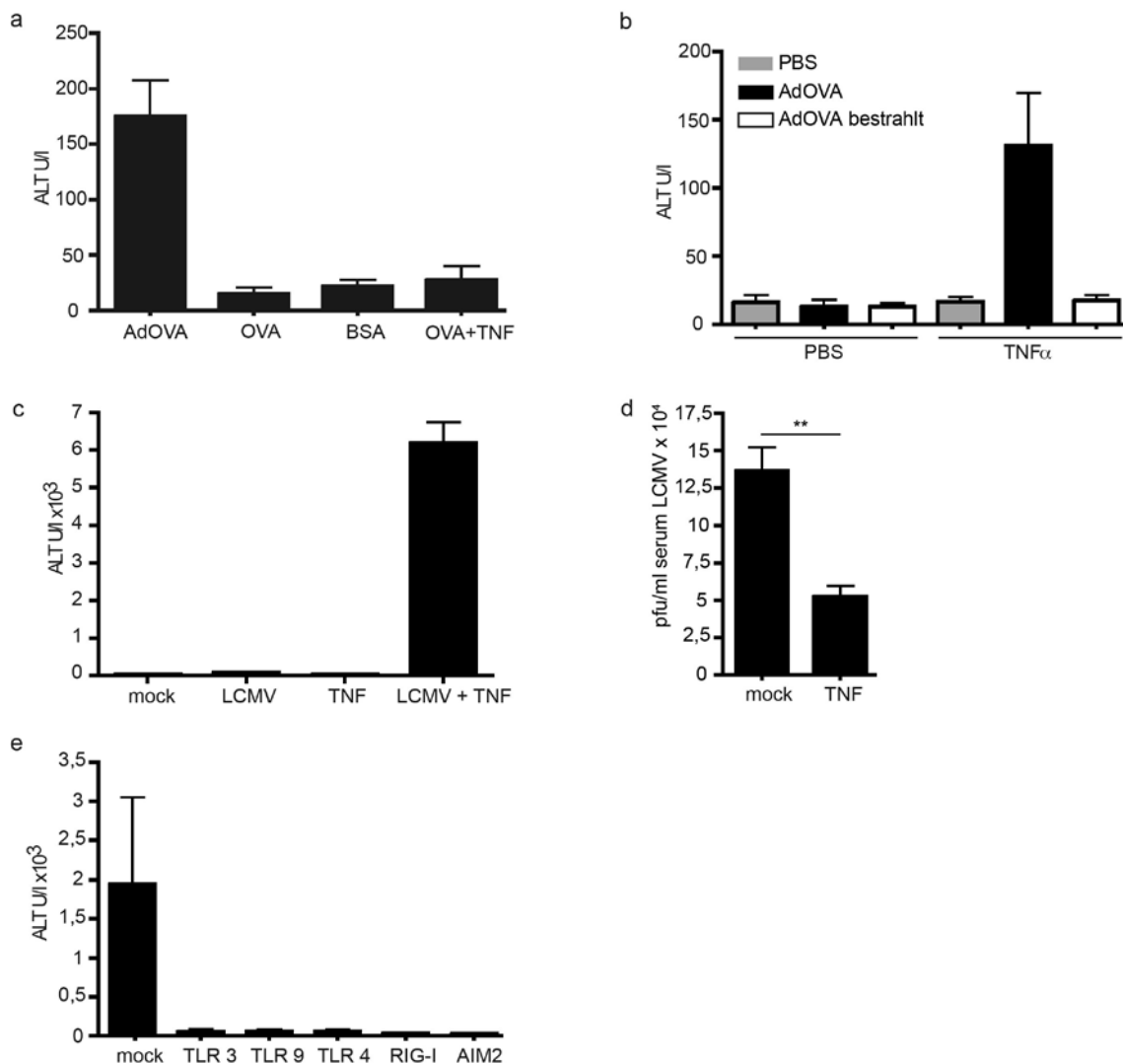


Abb. IV.10 Die virale Infektion sensibilisiert die Hepatozyten für den TNF-vermittelten Zelltod

(a) C57Bl/6 Mäuse wurden infiziert (AdOVA 2×10^8 PFU/Maus) oder 30Min. vor dem Transfer der aktivierten OT-I T Zellen mit OVA, BSA (2mg/Maus) oder OVA und TNF (400ng/Maus) behandelt. Die ALT-Messung erfolgte zwei Tage später. **(b)** Infektion der C57Bl/6 Mäuse mit AdOVA oder einem UV-bestrahltem AdOVA (2×10^8 PFU/Maus). Zwei Tage später i.v. Injektion von 400ng TNF oder PBS. ALT-Messung 4Std. später. **(c)** Zwei Tage nach Infektion mit LCMV (2×10^5 PFU/Maus) wurden die Mäuse mit 400ng/Maus TNF behandelt und die ALT nach 4Std. gemessen. **(d)** Ein Tag nach der LCMV Infektion wurde aus dem Serum mittels Plaque-Test der Virustiter bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. **(e)** Injektion der jeweiligen TLR-Liganden (siehe Material und Methoden) 1Std. vor der TNF-Applikation (400ng/Maus). 4Std. ALT-Messung. (a-e) $n = 4$ Mäuse pro Gruppe. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

9. Das Ausmaß der Hepatitis ist abhängig von der Virusmenge

Um herauszufinden, welchen Einfluss Dosis und Zeit auf die TNF-vermittelte Hepatitis haben, wurden Experimente mit steigender Konzentration des Virus und einer konstanten TNF-Dosis durchgeführt. Außerdem wurde die Kinetik der Hepatitis untersucht. Bei einer Infektion mit 1×10^8 PFU ist noch kein Anstieg der ALT, nach TNF-Injektion, zu beobachten (Abb. IV.11 a), weil hier nur wenige (ca. 10%) Hepatozyten infiziert sind (Abb. IV.11 b). Bei einer Infektion mit 1×10^9 PFU sind dagegen fast 90% der Hepatozyten infiziert (Abb. IV.11 b). Daraus resultiert ein massiver ALT Anstieg, welcher einer fulminanten Hepatitis gleichkommt (Abb. IV.11 a). Betrachtet man nun wie sich die Hepatitis nach der TNF-Applikation entwickelt, war nach 1Std. noch keine ALT Erhöhung feststellbar. Ein deutlicher Anstieg der ALT (Abb. IV.11 c) und erste Anzeichen eines Leberschadens waren nach 2Std. sichtbar (Abb. IV.11 d). In Leberschnitten, die direkt nach der TNF-Gabe angefertigt wurden, zeigte sich nach 2Std. teilweise zerstörtes Gewebe (Abb. IV.11 d). 4Std. nach der TNF-Applikation war der Höhepunkt des ALT Anstiegs erreicht (Abb. IV.11 c). Die Leberstruktur ist zu diesem Zeitpunkt größtenteils nicht mehr intakt (Abb. IV.11 d). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der infizierten Hepatozyten direkt mit dem Grad des Leberschadens zusammenhängen und nach 4Std. das Maximum erreicht ist.

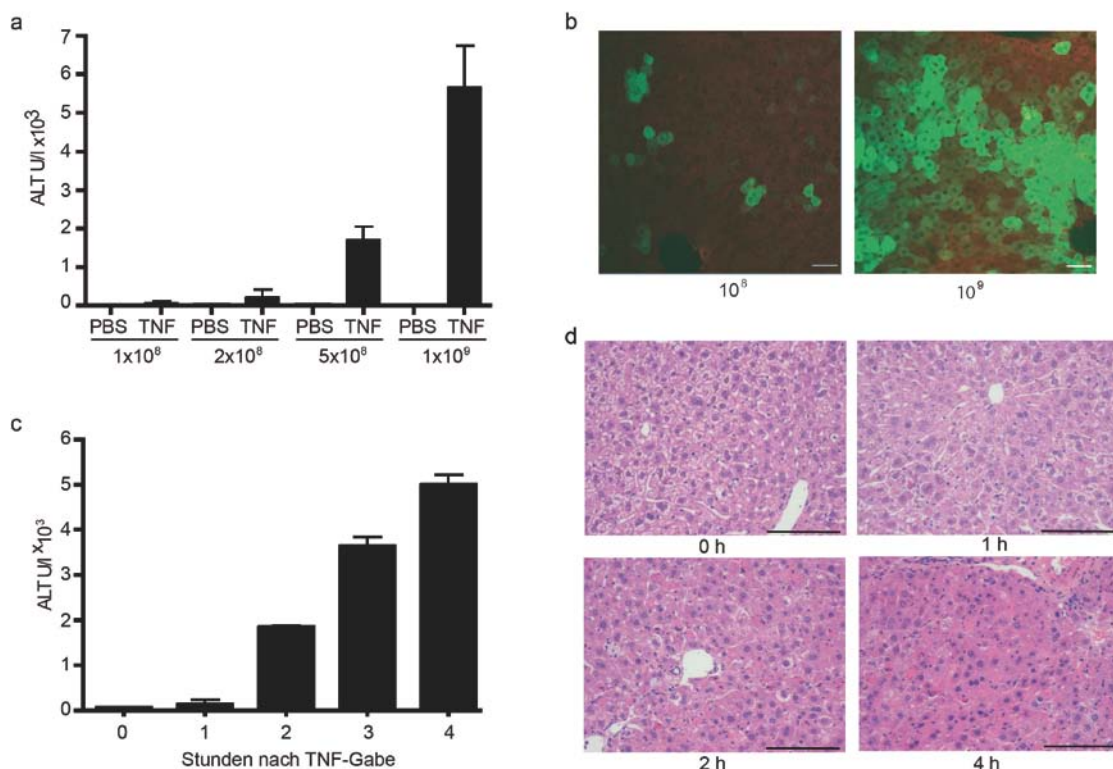


Abb. IV.11 Die Hepatitis hängt direkt mit der Anzahl infizierter Hepatozyten zusammen

(a) Zwei Tage nach Infektion mit steigender AdOVA- Konzentration wurde TNF injiziert (400ng/Maus) und 4Std später die ALT gemessen (n = 4 Mäuse pro Gruppe). (b) Konfokalmikroskopie von Leberschnitten die zwei Tage nach der AdGFP Infektion (1×10^8 oder 1×10^9 PFU/Maus) gefertigt wurden. (c, d) Zwei Tage nach AdOVA Infektion (1×10^9 PFU/Maus) wurde TNF injiziert (400ng/Maus) und an verschiedenen Zeitpunkten (c) die ALT gemessen oder (d) Leberschnitte und eine HE-Färbung angefertigt. Balkenlänge entspricht 200µm (n = 4 Mäuse pro Gruppe). Die Leberschnitte und die HE-Färbung wurden vom Institut für Pathologie der Universität Köln gefertigt. (a-d) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

10. Hepatozyten sind das primäre Ziel von TNF

FADD (*engl.* Fas-associated protein with death domain) ist ein essentielles Adapter-Protein im TNF-Rezeptor Signalweg (Chinnaiyan et al., 1996). Um zu testen welche Zellen das primäre Ziel von TNF sind, wurden Mäuse mit einem hepatozyten-spezifischer „knock out“ von FADD infiziert. So ist in den FADD^{fl/fl} x AFP-Cre^{pos} Mäusen der TNF-Signalweg in Hepatozyten blockiert. Nach Infektion mit Adenovirus und TNF-Injektion war in den FADD^{fl/fl} x AFP-Cre^{pos} Mäusen keine Hepatitisinduktion vorhanden (Abb. IV.12 a). Dies gilt ebenfalls für eine Infektion mit LCMV (Abb. IV.12 b). Somit wurde bestätigt, dass das TNF selektiv auf die Hepatozyten wirkt.

Eine Bestätigung ergab sich durch eine TUNEL-Färbung. Bei dieser immun-histologischen Färbung waren nur die infizierten Hepatozyten auch TUNEL positiv. Dies bedeutet, dass die Apoptoseinduktion nur stattfindet, wenn die Hepatozyten infiziert sind (Abb. IV.12 c, d). Außerdem waren keine uninfizierten Hepatozyten gleichzeitig TUNEL-positiv, was ein unspezifisches sterben der Hepatozyten ausschließt (Abb. IV.12 c, d). Dies zeigt, dass TNF sehr selektiv nur Hepatozyten tötet, die durch die Infektion sensitiviert wurden.

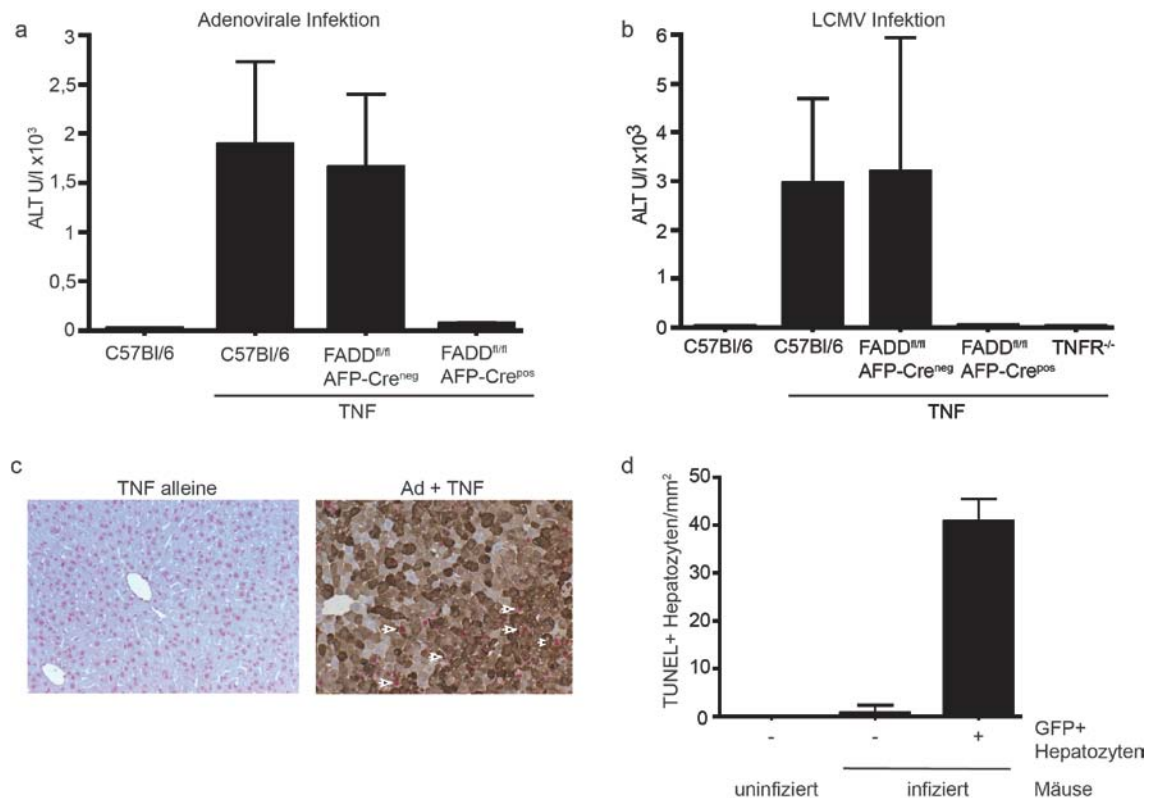


Abb. IV.12 TNF vermittelter Zelltod ist hepatozytenspezifisch

(a, b) C57Bl/6 Mäuse, FADD^{fl/fl} AFP-Cre^{neg} (Negativkontrolle) oder FADD^{fl/fl} AFP-Cre^{pos} (Mäuse mit einem hepatozytenspezifischen FADD „knock out“) wurden mit (a) AdOVA (5×10^8) oder (b) LCMV (2×10^5) infiziert, nach zwei Tagen mit TNF behandelt und 4Std. später die ALT gemessen (n = 4 Mäuse pro Gruppe). Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (c) Infektion wie in (a), 1Std. nach der TNF-Applikation wurden die Lebern entnommen, Schnitte gefertigt und eine TUNEL-Färbung durchgeführt (braun= GFP-Expression, rot= TUNEL-positive Zellkerne). Die Schnitte und die TUNEL-Färbung wurden vom Institut für Pathologie der Universität Köln gefertigt. (d) Anzahl der TUNEL-positiven Hepatozyten/mm².

11. TNF führt in infizierten Hepatozyten zur Apoptose

Es gibt zwei verschiedene Signalwege, die zur Apoptose führen. Den extrinsischen Signalweg, der über Todesrezeptoren läuft und den intrinsischen Signalweg der wegen der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien auch mitochondrialer Signalweg genannt wird.

Der extrinsische Signalweg wird z.B. über die Bindung von TNF an den TNFR1 eingeleitet. Bei der Signalweiterleitung spielt das Adaptermolekül FADD eine wichtige Rolle (Chinnaiyan et al., 1996). Diese essentielle Beteiligung von FADD zeigte sich in Mäusen mit einem hepatozytenspezifischen FADD „knock out“, die keine TNF-

vermittelte Apoptose entwickelten (Abb. IV.12 a). FADD rekrutiert und aktiviert, nach Bindung an den Rezeptor, im nächsten Schritt Caspase-8 (Wullaert et al., 2006). Durch die Hemmung der Caspase-8 Aktivierung mittels eines Caspase-8 Inhibitors, wurde die Hepatitis-Entstehung fast vollständig blockiert (Abb. IV.13 b). Caspase-8 kann durch direkte Aktivierung der Effektorcaspase-3 Apoptose auslösen. In Hepatozyten scheint dieser Caspase-8 Komplex sehr schwach zu sein und benötigt deshalb eine Amplifikation des Signals über den mitochondrialen Signalweg (Ding und Yin, 2004). So kann Caspase-8 Bid zu dessen aktiver Form tBid spalten. In Hepatozyten, die nach TNF-Injektion isoliert wurden, zeigte sich diese Spaltung von tBid nur, wenn die Hepatozyten infiziert und mit TNF behandelt wurden (Abb. IV.13 a). Die alleinige Infektion oder Applikation von TNF führten nicht zu dieser Spaltung (Abb. IV.13 a). tBid bindet an die Mitochondrien und rekrutiert Bak und Bax, welche dann Poren in den Membran formen. Dies führt dann zur Freisetzung von Zytocrom c. Tatsächlich wurde in den infizierten und TNF behandelten Hepatozyten eine höhere Expression von Bax gemessen, als in Hepatozyten die nur infiziert waren oder nur mit TNF behandelt wurden. Das freigesetzte Zytocrom c bildet dann einen Komplex mit Caspase-9, welcher dann die Effektorcaspase-3 aktiviert und so in der Zelle Apoptose auslöst (Li et al., 2002). Infizierte Hepatozyten exprimierten vermehrt Caspase-9, was durch Stimulation mit TNF noch gesteigert wurde (Abb. IV.13 a). Aber nur die Infektion und die Behandlung mit TNF führte endgültig zur Apoptose, denn nur hier wurde die Caspase-3 aktiviert (Abb. IV.13 a). Die Abhängigkeit vom mitochondrialen Apoptoseweg wurde nochmals verdeutlicht, indem ein Caspase-9 Inhibitor verwendet wurde, der in der Lage war, die Hepatitis in infizierten, TNF behandelten Mäuse fast vollständig zu unterdrücken (Abb. IV.13 b). Somit konnte gezeigt werden, dass der TNF-Rezeptor vermittelte Signalweg, zusammen mit dem mitochondrialen Signalweg, zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 und so zur Einleitung der Apoptose führt. Dass die Infektion eine zentrale Rolle in der Hepatitisinduktion spielt, zeigte sich auch an Mitochondrien, die aus infizierten Hepatozyten isoliert wurden. Diese reagierten sensibler auf eine Caspase-8 Behandlung und setzten, im Gegensatz zu Mitochondrien aus uninfizierten Hepatozyten, vermehrt Zytocrom c frei (Abb. IV.13 c). Hier konnte auch bei höheren Caspase-8 Gaben kaum Zytocrom c Freisetzung beobachtet werden (Abb. IV.13 c).

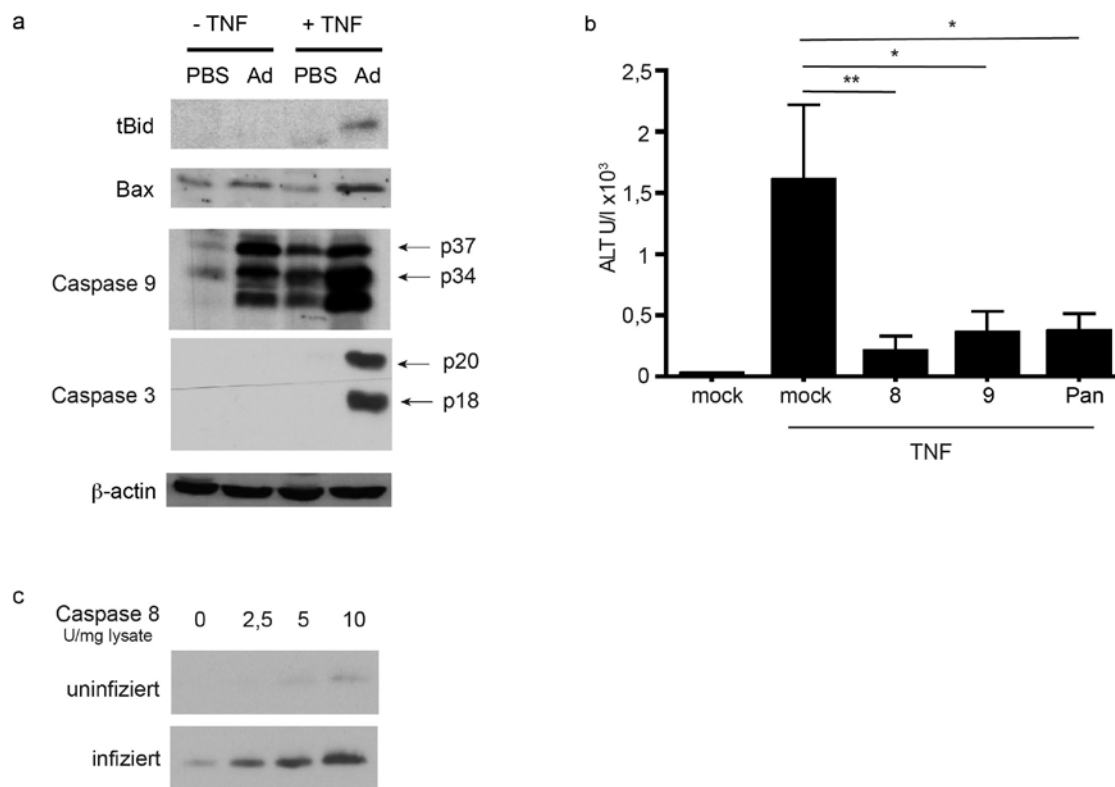


Abb. IV.13 Apoptoseinduktion infizierter Hepatozyten

(a) Zwei Tage nach Infektion (AdOVA 1×10^9 PFU/Maus) oder PBS Injektion wurden die Mäuse mit TNF oder PBS behandelt. Die Hepatozyten wurden 1Std. später isoliert und für einen Western Blot eingesetzt. (b) Die Mäuse wurden infiziert (AdOVA 5×10^8 PFU/Maus) und zwei Tage später mit Caspaseinhibitoren behandelt. 30Min. später wurde die Hepatitis mit TNF induziert ($n = 4$ Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 4 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. (c) Die Mitochondrien von infizierten und nicht infizierten Mäusen wurden isoliert, mit Caspase-8 behandelt und die Zytocrom c Ausschüttung mittels Western Blot bestimmt. Die Mitochondrien-Isolation und Zytocrom c Bestimmung wurde vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene (Arbeitsgruppe Kashkar) durchgeführt.

12. ROS ist an der TNF-vermittelten viralen Hepatitis beteiligt

Die Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor kann auch zur Aktivierung einer NADPH-Oxidase führen, die „reactive oxygen species“ (ROS) produziert (Kim et al., 2007; Yazdanpanah et al., 2009). Außerdem ist bekannt, dass ROS an der Pathogenese einer Hepatitis C Infektion (HCV) beteiligt ist (Choi et al., 2006). Um zu untersuchen, ob TNF auch in Zellpopulationen der Leber zur ROS Produktion führen, wurden Lymphozyten, Kupffer Zellen und Hepatozyten aus der Leber isoliert und in vitro TNF zugegeben. Verglichen mit unbehandelten Zellen konnte eine erhöhte ROS-Konzentration in allen Zellpopulationen nachgewiesen werden (Abb. IV.14 a).

Behandelte man die Mäuse zwei Tage nach der Infektion, kurz vor der TNF-Applikation mit ROS-Inhibitoren (Luteolin, Trolox oder MnTBAP) konnte gezeigt werden, dass die Hepatitis, im Vergleich zu den unbehandelten, deutlich reduziert war (Abb. IV.14 b). Da Hepatozyten die NOX2 NADPH Oxidase besitzen (Reinehr et al., 2005) sollte untersucht werden, ob die NOX2-vermittelte ROS Produktion hier beteiligt ist. Wurde die TNF-vermittelte virale Hepatitis in Mäusen induziert, die keine NOX2 NADPH Oxidase exprimieren, (gp91/NOX2^{-/-}) war die ALT stark reduziert (Abb. IV.14 b). Somit konnte bestätigt werden, dass ROS einen Einfluss auf die TNF-vermittelte Hepatitis besitzt, der NOX2 abhängig ist. Um zu prüfen, ob das ROS auch direkt in den Hepatozyten wirkt, wurde ein rekombinantes Adenovirus benutzt, welches Superoxid Dismutase (SOD) überexprimiert. Die SOD-Familie ist eine Enzymfamilie welche ROS katalytisch abbaut (McCord et al., 1969) und so unschädlich macht. Wurden Mäuse mit AdSOD infiziert und zwei Tage später mit TNF behandelt, war die Hepatitis fast vollständig unterdrückt, im Vergleich zu den Mäusen, die mit AdOVA infiziert wurden (Abb. IV.14 c). Da hier die SOD direkt in den Hepatozyten wirkt, lässt sich daraus schließen, dass das ROS auch direkt in den Hepatozyten auf die virale Hepatitis Einfluss nimmt.

Zusammenfassend wurde hier gezeigt, dass die TNF-vermittelte virale Hepatitis von der Caspase-Aktivierung und der Entstehung von ROS abhängen.

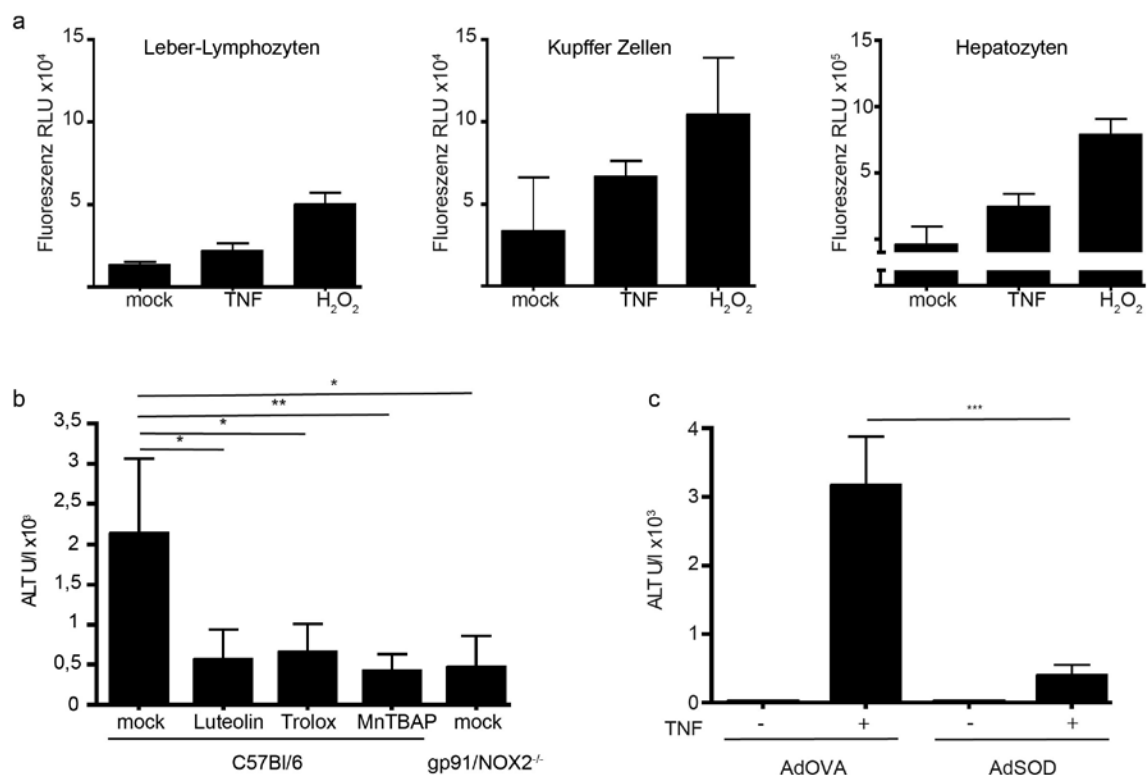


Abb. IV.14 ROS-Inhibition reduziert die TNF-vermittelte virale Hepatitis

(a) Isolierte Leber-Lymphozyten, Kupffer Zellen und Hepatozyten wurden mit TNF oder als Positivkontrolle mit H_2O_2 behandelt und mittels H_2DCFDA -Färbung die ROS-Produktion gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (b) Zwei Tage nach der Infektion wurden C57Bl/6 Mäuse oder $gp91/NOX^{-/-}$ Mäuse mit ROS-Inhibitoren behandelt (nur C57Bl/6) und 30Min. später TN injiziert (n = fünf Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten. (c) Die Mäuse wurden mit AdOVA oder AdSOD infiziert und zwei Tage später mit TNF behandelt. 4Std. später ALT-Messung (n = vier Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

13. Die Reduktion der XIAP-Expression ermöglicht in infizierten Hepatozyten die TNF-vermittelte Apoptose

TNF ist nur in der Lage, Hepatozyten durch Apoptose zu töten wenn, diese infiziert sind (Abb. IV.12 c, d). Deshalb stellte sich nun abschließend die Frage, welcher Mechanismus die infizierten Hepatozyten für die TNF-vermittelte Apoptose sensibilisiert, bzw. die Apoptose ohne vorherige Infektion verhindert. Das „x-linked inhibitor of apoptosis protein“ (XIAP) ist in der Lage, die enzymatische Aktivität von Initiator Caspasen (Caspase-9) und von Effektor-Caspasen (Caspase-3 und -7) zu inhibieren (Deveraux et al., 1997; Eckelman et al., 2006). Um zu untersuchen, welchen Einfluss die adenovirale Infektion und das TNF auf die XIAP-Expression besitzen, wurden Hepatozyten entweder direkt zwei Tage nach der adenoviralen Infektion isoliert oder die Hepatozyten wurden eine Stunde nach der Stimulation mit TNF isoliert. Die XIAP-Expression wurde dann mittels eines „Western Blots“ analysiert. Tatsächlich bewirkte die adenovirale Infektion im Vergleich zu uninfizierten Hepatozyten eine starke Reduktion der XIAP-Expression (Abb. IV.15 a). Diese Reduktion war auch nach der TNF-Gabe noch vorhanden (Abb. IV.15 a). Auch die Infektion mit LCMV bewirkt diese XIAP-Reduktion (Abb. IV.15 b). Somit wird durch die virale Infektion die hemmende Wirkung des XIAP auf die Caspasen aufgehoben und TNF kann in diesen so sensibilisierten Hepatozyten Apoptose induzieren. Um deutlich zu machen, dass dieser Mechanismus für die TNF-vermittelte virale Hepatitis Entstehung von zentraler Bedeutung ist, wurde in infizierten Hepatozyten der normale XIAP Proteinlevel wiederhergestellt. Dafür wurde ein rekombinantes Adenovirus benutzt, welches XIAP exprimiert. Die XIAP-Expression in den AdXIAP infizierten Hepatozyten ist vergleichbar mit der XIAP-Expression uninfizierter Hepatozyten (PBS) (Abb. IV.15 c). Eine Infektion von Mäusen mit diesem AdXIAP ergab eine fast vollständige Hemmung der Hepatitis (Abb. IV.15 d). Somit bewirkte das wiederhergestellte XIAP die Hemmung der

Caspasen und die Hepatozyten waren nicht mehr für die TNF-vermittelte Apoptose sensitiv.

Dies bedeutet, dass XIAP die zentrale Kontrolle besitzt, ob der Hepatozyt überlebt oder bei Infektion durch TNF-vermittelte Apoptose stirbt.

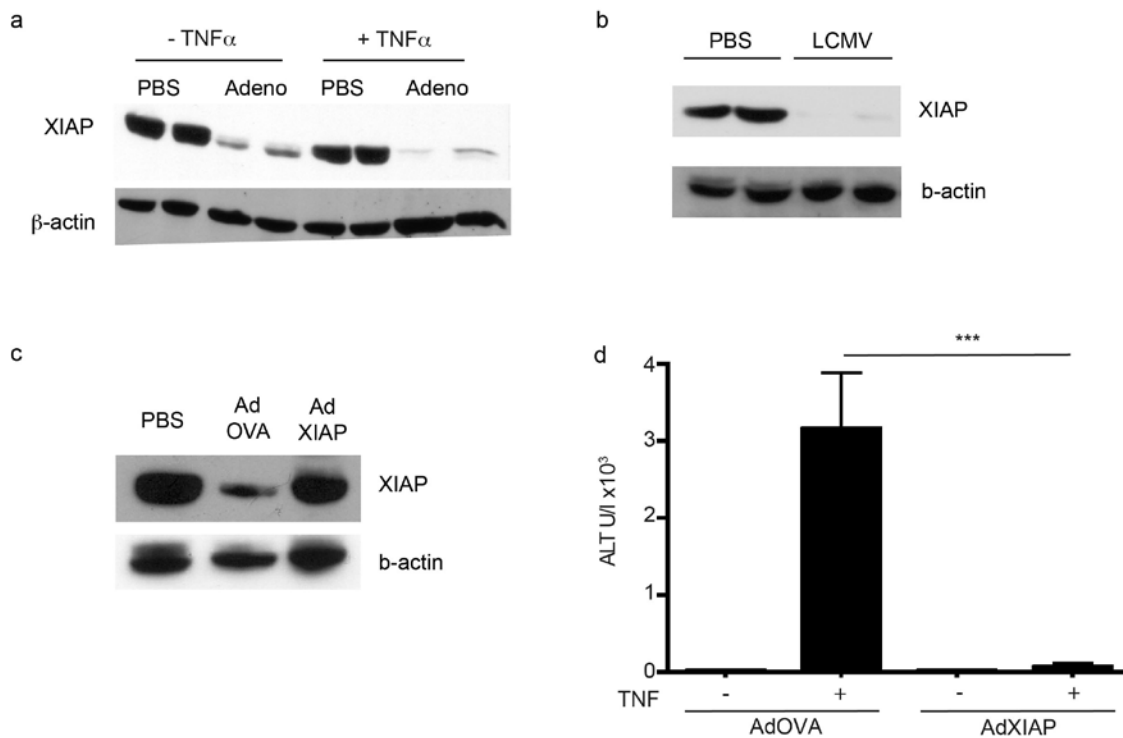


Abb. IV.15 XIAP hemmt die Apoptose in nicht infizierten Hepatozyten

(a, b) Die Mäuse wurden mit AdOVA/LCMV infiziert oder mit PBS behandelt und zwei Tage später wurde TNF oder PBS injiziert. 1Std. später wurden die Hepatozyten isoliert und ein XIAP Western Blot angefertigt. (c) XIAP-Expression im Western Blot zwei Tage nach Infektion mit AdOVA oder AdXIAP. (d) Infektion der Mäuse mit AdOVA oder AdXIAP, zwei Tage später Behandlung mit TNF und ALT-Messung 4Std. später (n = 4 Mäuse pro Gruppe). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt.

V. Diskussion

Damit eine virale Infektion der Leber effektiv bekämpft werden kann, müssen die innaten und adaptiven Immunmechanismen zusammen agieren. Jedoch spielen zytotoxische T Zellen die zentrale Rolle in der Kontrolle einer viralen Hepatitis (Ando et al., 1994; Guidotti et al., 1996). Dafür müssen CD8 T Zellen zunächst zu zytotoxischen T Zellen reifen. Dies geschieht durch die Kreuzpräsentation von viralem Antigen auf Dendritischen Zellen in den lymphatischen Organen und anschließender Wanderung der zytotoxischen T Zellen ins Zielorgan (Sigal et al., 1999). Es wurde bisher angenommen, dass die Aktivierung der zytotoxischen T Zelle nur durch direkte Antigenerkennung auf dem infizierten Hepatozyten zu einer Hepatitis führt. Dieser direkte Kontakt wird durch die Fenestrae der LSEC ermöglicht, durch die sich die T Zellen schieben können (Warren et al., 2006). Es ist jedoch fraglich, ob dieser Mechanismus ausreichend ist, um alle infizierten Hepatozyten zu eliminieren. Außerdem sind einige Viren dazu fähig, einer Immunantwort zu entkommen, indem sie die MHC I-Präsentation beeinflussen bzw. verhindern können (Yewdell und Bennink, 1999). Da das „cross priming“ dadurch nicht beeinflusst wird, entstehen zytotoxische T Zellen, die ihre Zielzelle eliminieren wollen, dazu aber nicht in Lage sind, weil die infizierte Zielzelle durch die gestörte MHC I-Präsentation nicht erkannt und eliminiert werden kann (Holtappels et al., 2004). Diese Mechanismen, die Viren entwickelt haben, um dem Immunsystem zu entkommen, werden als viraler „immune escape“ bezeichnet. Obwohl es bis jetzt keinen Hinweis darauf gibt, dass auch HBV und HCV die MHC I-Expression beeinflussen können, wurde für hepatotrope Adenoviren gezeigt, dass sie den zytotoxischen T Zellen entkommen, indem sie in den infizierten Zellen die Transkription von Genen hemmen, die für die MHC I-Expression notwendig sind (Blair und Blair-Zajdel, 2004). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass zytotoxische T Zellen einen Effektor-Mechanismus besitzen, der virusinfizierte Hepatozyten auch ohne die direkte MHC I-Erkennung eliminieren kann und so in der Lage ist, diesem viralen „immune escape“ zu entkommen.

1. Die Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Hepatitis-Induktion

Wenn die zu Effektorzellen gereiften zytotoxischen CD8 T Zellen zurück in die Leber wandern, um ihre Zielzelle, in diesem Falle die infizierten Hepatozyten, zu töten, wird angenommen, dass sie ihre Effektorfunktionen nur ausüben können, wenn eine direkt MHC I-Erkennung der infizierten Zielzelle stattfindet. Um die Frage zu beantworten, ob die MHC I-Präsentation auf der infizierten Zielzelle notwendig ist, wurden hier transgene Mäuse mit einer zelltyp-spezifischen MHC I-Präsentation genutzt, in denen mittels eines Adenovirus, welches nur Hepatozyten infiziert und dem Transfer von zytotoxischen T Zellen eine virale Hepatitis ausgelöst wurde. So konnte gezeigt werden, dass bei der ausschließlichen MHC I-Präsentation auf Hepatozyten eine geringere Hepatitis ausgelöst wurde, als bei Wildtypmäusen, die eine ubiquitäre MHC I Präsentation besitzen. Das bedeutet, dass die alleinige Interaktion von zytotoxischen T Zellen mit den Hepatozyten die Hepatitis und somit die Elimination der Hepatozyten nicht ausreichend induzieren kann. Somit muss die Kreuzpräsentation anderer Zellpopulation der Leber eine Rolle für die Aktivierung der zytotoxischen T Zellen spielen. Durch die Depletion von Makrophagen oder Dendritischen Zellen konnte gezeigt werden, dass diese zur Kreuzpräsentation fähigen Zellpopulationen an der Aktivierung der zytotoxischen T Zellen nicht beteiligt waren. Im Gegensatz dazu waren LSEC in der Lage, durch die Kreuzpräsentation von viralem Antigen, welches von infizierten Hepatozyten stammt, eine Hepatitis auszulösen, die mit den Wildtypmäusen vergleichbar war. Die Elimination der Hepatozyten war dabei auch ohne die direkte MHC I-Erkennung der infizierten Hepatozyten möglich. Es wurde bereits nachgewiesen, dass LSEC zur Kreuzpräsentation fähig und dabei genauso effizient wie CD8⁺ Dendritische Zellen sind (Schurich et al., 2009). Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass bei alleiniger Kreuzpräsentation der LSEC die Akkumulation von Lymphozyten und der Leberschaden größer war, als in den Mäusen die nur hepatozytenspezifische MHC I-Präsentation besitzen. Deshalb handelt es sich bei LSEC um eine einzigartige antigenpräsentierende Zellpopulation, die in der Lage sind, CD8 T Zellen aus dem Blutstrom zu rekrutieren (von Oppen et al., 2009).

Werden lösliche Antigene aus dem Blut an naive CD8 T Zellen kreuzpräsentiert, führt das zur Toleranz-Induktion (Limmer et al., 2000; Diehl et al., 2008). Es konnte aber hier gezeigt werden, dass die Situation völlig anders ist, wenn die CD8 T Zellen bereits zu zytotoxischen T Zellen gereift sind. Dann führt die Kreuzpräsentation von viralem Antigen auf LSEC zur Aktivierung der zytotoxischen T Zellen und kreuzpräsentierende LSEC sowie die infizierten Hepatozyten werden ohne eine direkte MHC I-Erkennung

eliminiert. So tragen LSEC zur effektiven Immunüberwachung bei, ohne dass die Toleranzmechanismen dieser Zellen die Aktivität der Effektorfunktionen zytotoxischer T Zellen beeinflusst.

2. Kreuzpräsentation von LSEC vermittelt antivirale Immunität

Die Elimination des Virus ist die wichtigste Aufgabe der zytotoxischen CD8 T Zellen. Deshalb wurde hier auch untersucht, welchen Einfluss die Kreuzpräsentation auf die antivirale Immunität besitzt. Es stellte sich heraus, dass die alleinige Kreuzpräsentation von LSEC eine frühe und schnelle zytotoxische T Zell-vermittelte antivirale Immunität entwickelte. Im Gegensatz zur direkten Antigenpräsentation und Aktivierung der zytotoxischen T Zellen auf den infizierten Hepatozyten selbst, die eine längeren Zeitraum benötigte, um die gleichen antiviralen Effekte zu erzielen. Dies deutet darauf hin, dass die Kreuzpräsentation vor allem in der frühen Phase der antiviralen CD8 T Zell Immunität wichtig ist und später, zusammen mit der direkten Antigenpräsentation auf Hepatozyten, für die Eliminierung des Virus von Bedeutung ist. Somit konnte hier gezeigt werden, dass die Kreuzpräsentation in der Lage ist, eine zytotoxische T Zell-Immunität zu vermitteln, auch wenn die MHC I-Präsentation auf den infizierten Hepatozyten vollständig fehlt. Die direkte Antigenpräsentation auf der infizierten Zelle könnte dann zu Zeitpunkten wichtig sein, wenn keine viralen Antigene von der infizierten Zelle frei werden und so die LSEC nicht kreuzpräsentieren können.

Die zytotoxische T Zell-vermittelte Immunität könnte auch in anderen Organen von mikrovasulären Endothelzellen beeinflusst werden. Im Pankreas und an der Blut-Hirn-Schranke führt die Kreuzpräsentation von mikrovaskulären Endothelzellen zur Transmigration von zytotoxischen T Zellen in diese Organe (Galea et al., 2007; Savinov et al., 2003). Jedoch führten die Endothelzellen meist nicht zu einer Aktivierung sondern zu einer Rekrutierung zytotoxischer T Zellen, die durch eine vermehrte lokale Chemokinexpression im infizierten Organ, wie der Niere, hervorgerufen wurde (Heymann et al., 2009). Es kann daher auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einem späteren Zeitpunkt der viralen Hepatitis zu einer Chemokin-vermittelten Rekrutierung von zytotoxischen T Zellen kommt. Dennoch spielt die antigenspezifische Aktivierung der zytotoxischen T Zellen durch die Kreuzpräsentation der LSEC eine zentrale Rolle bei der Einleitung der Hepatitis.

3. TNF aus zytotoxischen T Zellen vermittelt virale Hepatitis

Da somit gezeigt wurde, dass die Kreuzpräsentation der LSEC das initiale Ereignis ist, um die Effektor-Mechanismen der zytotoxischen T Zellen zu aktivieren und so die Hepatozyten MHC I-unabhängig zu eliminieren, war nun von Interesse, die Effektor-Mechanismen der zytotoxischen T Zellen zu untersuchen. Dabei konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die LSEC durch die Kreuzpräsentation von den zytotoxischen T Zellen getötet werden. Wenn das Endothel zerstört wird, kommt es zum Kontakt von Thrombozyten mit den darunterliegenden Matrixproteinen und infolgedessen zu deren Aktivierung und Thrombusbildung (Wu et al., 1996). Dies könnte zu einer Unterversorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen führen und die Hepatozyten würden sterben. Es stellte sich aber heraus, dass zwar eine Akkumulation von Thrombozyten nach der Hepatitisinduktion zu sehen war, diese jedoch die Hepatitis nicht beeinflusste, was durch die Depletion der Thrombozyten bestätigt werden konnte. Dies spricht gegen Untersuchungen die zeigen, dass Thrombozyten bei einer viralen Infektion der Leber aktiviert werden und durch eine gestörte Mikrozirkulation das Ausmaß der Hepatitis verstärken (Iannacone et al., 2005; Lang et al., 2008).

Somit war der Mechanismus, wie die zytotoxischen T Zellen zur Eliminierung ohne den direkten Kontakt zur infizierten Zelle beitragen, noch ungeklärt. Neben der Perforin/Granzym- und Fas-vermittelten Effektor-Mechanismen der zytotoxischen T Zellen, die den direkten Kontakt zur Zielzelle benötigen, gibt es auch noch einen dritten Weg, der über Zytokine wie TNF und $\text{IFN}\gamma$ vermittelt wird (Andersen et al., 2006). Außerdem sind TNF, Typ I- und Typ II-Interferone an der antiviralen Immunität und dem Leberschaden während einer viralen Infektion der Leber beteiligt (Guidotti und Chisari, 2001; Lang et al., 2006). Mittels den entsprechenden Rezeptor „knock out“ Mäusen wurde gezeigt, dass weder Typ I noch Typ II Interferone beteiligt waren. Jedoch konnte TNF als Hauptfaktor identifiziert werden, der für die Induktion der viralen Hepatitis verantwortlich ist. Es geht auch aus anderen Untersuchungen hervor, dass TNF-Rezeptor „knock out“ Mäuse in verschiedenen Modellen einen geringeren Leberschaden zeigen (Tsukamoto und Lu, 2001).

Auf der Suche nach der Quelle des TNF konnte hier gezeigt werden, dass die zytotoxischen T Zellen das TNF nach Antigenstimulation durch die Kreuzpräsentation von LSEC produzierten und so die Hepatitis induzierten. Die TNF-Produktion konnte dabei sowohl intrazellulär in den zytotoxischen T Zellen nach der Hepatitisinduktion nachgewiesen werden, als auch im Überstand von kreuzpräsentierenden LSEC, die mit zytotoxischen T Zellen kokultiviert wurden. Es ist bekannt, dass zytotoxische T

Zellen nach Antigen Erkennung TNF sekretieren (Ratner und Clark, 1993). Obwohl es natürlich möglich ist, dass Zellen wie Makrophagen (Mosser und Edwards, 2008), Neutrophile (Nathan et al., 2006) oder NK/T Zellen (Gao et al., 2009) TNF produzieren und so die Ausschüttung amplifizieren können, wurde hier gezeigt, dass TNF, welches nur von den zytotoxischen T Zellen stammte, eine vergleichbare Hepatitis auslöste, wie in Mäusen in denen alle Zellen zur TNF-Produktion fähig waren. Der Leberschaden war mehr als 40% reduziert, wenn die zytotoxischen T Zellen kein TNF produzieren konnten. Dies spricht dafür, dass die TNF-vermittelte Effektorfunktion auch neben den anderen Effektor-Mechanismen eine wichtige Rolle spielt.

Da in dieser Arbeit nur mit transgenen Mäusen gearbeitet wurde, die weder den TNFR1 noch den TNFR2 exprimieren (TNFR1+2^{-/-}), konnte nicht bestätigt werden welcher TNF-Rezeptor hier die entscheidende Rolle spielt. Es ist jedoch bekannt, dass nur der TNFR1 eine Todesdomäne besitzt und so in der Lage ist, den Zelltod auszulösen (Tartaglia et al., 1993). Somit kann davon ausgegangen werden, dass vor allem der TNFR1 an der Induktion der viralen Hepatitis beteiligt ist. TNF kommt in einer membran-gebundenen (mTNF) und in einer löslichen Form (sTNF) vor. Da der TNFR1 von beiden Formen des TNFs aktiviert werden kann, könnten auch beide Formen an der Hepatitisinduktion beteiligt sein. Es konnte allerdings bestätigt werden, dass das lösliche TNF eine zentrale Rolle spielt, denn dieses konnte im Überstand von zytotoxischen T Zellen nachgewiesen werden, die durch Kreuzpräsentation mit LSEC stimuliert wurden. Außerdem konnte im *in vivo* Modell nachgewiesen werden, dass durch Injektion von löslichem TNF in infizierten Mäusen eine Hepatitis ausgelöst werden konnte.

4. Die virale Infektion macht Hepatozyten für TNF sensitiv

Die Kreuzpräsentation spielt für die TNF-Produktion von zytotoxischen T Zellen und die daraus resultierende Hepatitis eine zentrale Rolle. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Kreuzpräsentation durch LSEC und die anschließende TNF-Ausschüttung die Hepatitis auslösen können. Es stellte sich heraus, dass die Kreuzpräsentation und die Ausschüttung von TNF alleine nicht für eine Hepatitis Entstehung ausreichend war. Daraus kann geschlossen werden, dass die virale Infektion ein entscheidender Faktor sein muss. Mittels eines vereinfachten Modells, bei dem die Infektion der Hepatozyten und anschließender TNF-Applikation einen Leberschaden verursacht, konnte bestätigt werden, dass die Infektion der Hepatozyten unerlässlich ist. Denn TNF löste ohne eine

Infektion keine Hepatitis aus. Dieser Sensibilisierungsmechanismus, der durch die virale Infektion vermittelt wird und die Hepatozyten für TNF empfänglich macht, konnte hier auch für das replikationskompetente LCMV gezeigt werden.

Auf der Suche nach dem Mechanismus, wie die Infektion die Hepatozyten sensibilisiert, konnte eine Beteiligung von „Pattern Recognition“ Rezeptoren (PRR), die virale DNA und RNA erkennen, ausgeschlossen werden.

In einer TUNEL-Färbung konnte bestätigt werden, dass nur infizierte Hepatozyten sterben. Denn nach TNF-Gabe waren nur die infizierten Hepatozyten TUNEL-positiv, im Gegensatz zu uninfizierten Hepatozyten, die TUNEL-negativ waren. Außerdem zeigten Tiere mit einem hepatozytenspezifischen FADD-„knock out“, dass TNF ausschließlich auf die Hepatozyten wirkt. Das bedeutet, dass es zu keinem kollateralen Schaden benachbarter Zellen kommt und nur die infizierten Hepatozyten durch das TNF sterben. FADD (*engl.* Fas-associated protein with death domain) ist ein essentielles Adapter-Protein im TNF-Rezeptor Signalweg (Chinnaiyan et al., 1996). Da FADD auch an der Fas-vermittelten Apoptose beteiligt ist, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der Fas-Ligand eine zusätzliche Rolle in diesem Effektor-Mechanismus spielt. Da aber die virale Hepatitis ausschließlich von TNF und dem TNF-Rezeptor abhängt und die Tatsache, dass TNF-defiziente zytotoxische T Zellen eine stark reduzierte Hepatitis auslösen, spricht gegen die Notwendigkeit anderer Effektor-Mechanismen.

5. Die infizierten Hepatozyten sterben durch TNF-vermittelte ROS und Caspase-abhängige Apoptose

Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zur TNF-vermittelten viralen Hepatitis führen, zeigten, dass in den infizierten Hepatozyten Caspase-8 und -9-abhängige Apoptose mittels TNF ausgelöst wurde. Die Bindung von TNF an den TNFR1 löst Apoptose aus, indem Casapse-8 rekrutiert und aktiviert wird (Hsu et al., 1995). In Hepatozyten ist diese Caspase-8 Aktivierung sehr schwach und benötigt deshalb eine Amplifikation des Signals über den mitochondrialen Signalweg (Ding und Yin, 2004). Dies zeigt, dass durch die nachgewiesene Spaltung von Bid auch hier der mitochondriale Signalweg für die Apoptoseinduktion der infizierten Hepatozyten beteiligt ist.

Die Beteiligung von ROS an der TNF-vermittelten Apoptose der infizierten Hepatozyten wurde mittels ROS-Inhibitoren bestätigt, die die Hepatitis fast vollständig unterdrücken

konnten. TNF ist bekannt dafür, vielfältige Funktionen ausüben zu können. Unter anderem wurde bereits nachgewiesen, dass TNF durch die Bindung an den TNFR1 mittels der NADPH Oxidase zur ROS-Produktion führen kann (Yazdanpanah et al., 2009). Auch hier konnte bestätigt werden, dass die NADPH-Oxidase NOX2 an der Hepatitis Entstehung beteiligt ist.

Es wurde also gezeigt, dass ROS und der mitochondriale Apoptosesignalweg durch TNF induziert werden und hier für die Hepatitis Entstehung essentiell sind. Die Tatsache, dass Mitochondrien aus infizierten Hepatozyten sensibler auf Caspase-8 reagieren und so Zytocrom c ausschütten, könnte mit der Entstehung von ROS zusammenhängen. Denn die Behandlung von Herzmuskelzellen mit ROS führt zur Ausschüttung von Zytocrom c (Cook et al., 1999). So könnte mit Hilfe von ROS der mitochondriale Apoptose-Signalweg amplifiziert werden und so in infizierten Hepatozyten durch die Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3 zur Apoptose führen.

6. XIAP kontrolliert die TNF-vermittelte Apoptose-Induktion in infizierten Hepatozyten

Die Kontrolle, ob der Hepatozyt durch TNF stirbt oder überlebt übernimmt hier XIAP. Mittels direkter Bindung ist XIAP in der Lage, Caspase-3 und -9 zu inhibieren (Deveraux et al., 1997; Eckelman et al., 2006). Da hier gezeigt werden konnte, dass die XIAP-Expression in infizierten Hepatozyten stark reduziert wurde, fehlt so diese Inhibition der Caspase-3 und -9 und ermöglicht die Apoptose. Somit konnte erklärt werden, wieso die Hepatozyten, die nicht infiziert waren, trotz TNF-vermittelter Apoptose-Induktion nicht sterben. Erst durch die Infektion wird die XIAP-vermittelte Inhibition der Caspase-3 und -9 aufgehoben und die Apoptose kann abgeschlossen werden. Die Wiederherstellung der XIAP-Expression führte dann erwartungsgemäß auch in infizierten Hepatozyten zur Reduktion der Hepatitis.

XIAP übernimmt hier die Kontrollfunktion über die Hepatozyten, die ohne eine Infektion, auch bei TNF-Ausschüttung, durch die XIAP-Expression vor der Apoptose geschützt sind und bei Infektion durch den Verlust von XIAP durch das TNF mittels ROS und Caspase-Aktivierung getötet werden. Die reduzierte XIAP-Expression nach Infektion konnte auch schon bei einer Reovirusinfektion beobachtet werden, die 12 Stunden nach der Infektion von HEK-Zellen geschnittenes XIAP und Apoptoseinduktion bewirkte (Kominsky et al., 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass

die XIAP-Expression in Jurkat-Zellen reduziert war, wenn diese mit HIV-1 infiziert sind, was zu einer verstärkten Apoptose führte (Wang et al., 2010). Im Vergleich zu Jurkat-Zellen, die mit HIV-2 infiziert wurden und eine höhere XIAP-Expression und eine niedrigere Apoptoserate aufwiesen (Wang et al., 2010). Es ist deshalb denkbar, dass die verminderte XIAP-Expression nach einer Virusinfektion es ermöglicht diese virusinfizierten Zellen durch Apoptose zu töten. Wie hier gezeigt werden konnte, muss die infizierte Zelle dafür nicht einmal über die direkte MHC I-Präsentation erkannt werden. Die zytotoxischen T Zellen werden initial durch die Kreuzpräsentation der LSEC aktiviert und produzieren daraufhin TNF, welches dann die infizierten Hepatozyten tötet.

Dieser Mechanismus könnte so vorteilhaft für die antivirale Immunität sein. Denn Viren haben viele Mechanismen entwickelt, die dazu führen, dass die Infektion entweder nicht erkannt wird oder die Immunmechanismen gestört oder unterdrückt werden. Virale Proteine können z.B. bei einer HCV Infektion die $\text{IFN}\alpha/\beta$ -Induktion beeinflussen und so die antiviralen Mechanismen unterbinden (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999). Außerdem besitzen einige Viren die Fähigkeit die MHC I-Präsentation zu beeinflussen oder zu verhindern und können so einer Immunantwort entkommen (Yewdell und Bennink, 1999). Zudem wurde beschrieben, dass eine gestörte Erkennung der Virusinfektion durch die innate Immunrezeptoren wie TLRs, die Eliminierung der infizierten Zellen verhindert (Bowie und Unterholzner, 2008). Die Effektorfunktion, die hier beschrieben wurde, ist unabhängig von der MHC I-Erkennung der infizierten Zelle und unabhängig von der Aktivierung von „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs). Somit ist sie in der Lage, den viralen Mechanismen zu entgehen, die bewirken, dass das Immunsystem eine Infektion nicht erkennt. Diese Effektorfunktion sorgt zusätzlich dafür, dass TNF nur die infizierten Hepatozyten eliminiert und es zu keinem kollateralen Schaden nicht infizierter Hepatozyten kommt. Denn weder TNF, noch die Abnahme der hemmenden Wirkung von XIAP durch die Infektion sind alleine dazu fähig eine Hepatitis auszulösen. Nur das Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen führt zur Eliminierung der Hepatozyten. Dies ist von Bedeutung, wenn Hepatozyten in Kontakt mit mikrobiellen Stimuli von Darmbakterien kommen, die physiologisch im Blut vom Darm in die Leber gelangen (Jacob et al., 1977), und so zur TNF-Ausschüttung von Kupffer Zellen führt (Knolle und Gerken, 2000). TNF ist bekannt dafür Funktionen auszuüben, die sehr gegensätzlich wirken, wie die Apoptoseinduktion und immunstimulatorische Aufgaben (Aggarwal, 2003). Es ist aber noch nicht bekannt welche Faktoren über die Wirkung des TNF entscheiden. Es konnte hier gezeigt werden, dass die verminderte XIAP-Expression, ausgelöst durch Infektion, einen solchen regulierenden Faktor darstellt, der es erlaubt die Zielzelle

zu eliminieren, wobei TNF dann in nicht infizierten Zellen seine immunstimulatorische Wirkung entfalten kann. Wenn TNF z.B. in Therapien gegen rheumatoide Arthritis gehemmt wird, kann eine Reaktivierung der HBV-Infektion bei inaktiven HBsAg Trägern ausgelöst werden (Chung et al., 2009).

Da die XIAP-Expression in vielen Tumoren und Krebs-Zelllinien im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht ist (Fong et al., 2000; Tamm et al., 2000), wurde XIAP zu einem aussichtsreichen Zielmolekül in der Krebstherapie. Dabei gibt es mehrere Ansätze, wie „Antisense-Moleküle“ gegen XIAP (LaCasse et al., 2005) oder sogenannten SMAC-„Mimetics“ die an IAPs binden und diese inhibieren können (Li et al., 2004). Diese Strategien, welche die XIAP-Expression und Wirkung hemmen, könnten auch bei chronischen oder persistierenden Infektionen eingesetzt werden. Gerade HBV und HCV Infektionen verlaufen häufig chronisch und sind nur schwer unter Kontrolle zu halten. Es konnte hier gezeigt werden, dass die XIAP-Expression, durch die virale Infektion, fast völlig verschwand. Es gibt viele Gründe wieso das Immunsystem eine virale Infektion nicht kontrollieren kann. Es ist denkbar, dass die chronisch HBV oder HCV infizierten Zellen nicht für Apoptose sensitiv sind, weil das XIAP zu stark exprimiert wird. In einer persistent exprimierenden HBV-Zelllinie (HepG2.215) wurde nachgewiesen, dass die Expression von IAPs erhöht war im Vergleich zu einer nicht HBV negativen Hepatozyten-Zelllinie (HepG2) (Lu et al., 2005). Dies könnte ein Hinweis für die erhöhte Expression von IAPs in langfristig HBV infizierten Zellen sein (Lu et al., 2005).

Zusammenfassend konnte hier eine neue Effektorfunktion von zytotoxischen T Zellen gezeigt werden, die ohne eine direkte MHC I-Erkennung die infizierte Zelle mittels TNF und der Sensitivierung über die XIAP-Reduktion zu einer ROS und Caspase-abhängigen Apoptose führt (Abb. V.1). Diese neu beschriebene Effektorfunktion der zytotoxischen T Zellen kann dabei helfen persistente virale Infektionen besser zu verstehen und neue Therapieansätze zu finden.

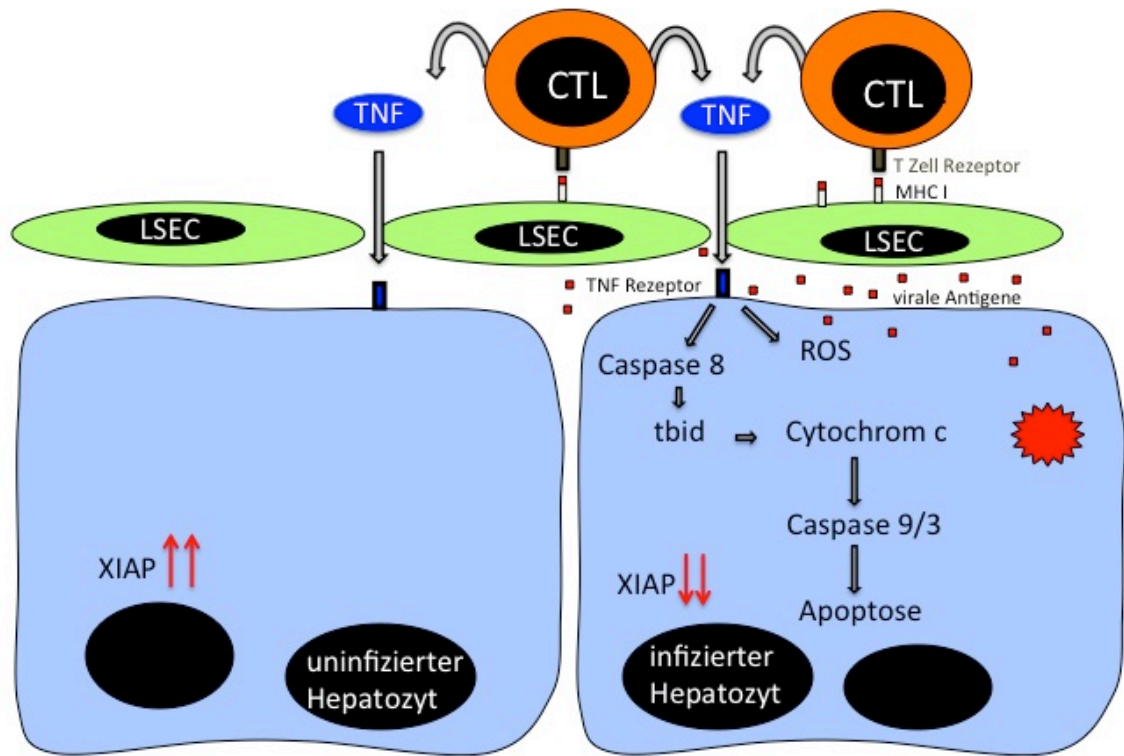


Abb. V.1 Zusammenfassendes Schaubild der TNF-vermittelten viralen Hepatitis

VI. Literaturverzeichnis

- Abougergi, M. S., Gidner, S. J., Spady, D. K., Miller, B. C., & Thiele, D. L. (2005). Fas and TNFR1, but not cytolytic granule-dependent mechanisms, mediate clearance of murine liver adenoviral infection. *Hepatology*, 41(1), 97-105.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, 3(9), 745-756.
- Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T., van Lint, A. L., Wakim, L. M., Heath, W. R., et al. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science*, 301(5641), 1925-1928.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., et al. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 126(1), 32-41.
- Ando, K., Guidotti, L. G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., et al. (1994). Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *Journal of immunology*, 152(7), 3245-3253.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. [Review]. *Trends in cell biology*, 11(9), 372-377.
- Berg, D., Stuhmer, T., Siegmund, D., Muller, N., Giner, T., Dittrich-Breiholz, O., et al. (2009). Oligomerized tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand strongly induces cell death in myeloma cells, but also activates proinflammatory signaling pathways. *FEBS J*, 276(23), 6912-6927.
- Bertolino, P., McCaughan, G. W., & Bowen, D. G. (2002). Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunology and cell biology*, 80(1), 84-92.
- Bertolino, P., Trescol-Biemont, M. C., & Rouboudin-Combe, C. (1998). Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol*, 28(1), 221-236.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, 143(5), 1283-1288.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.

- Blair, G. E., & Blair-Zajdel, M. E. (2004). Evasion of the immune system by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, 3-28.
- Blouin, A., Bolender, R. P., & Weibel, E. R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of cell biology*, 72(2), 441-455.
- Bowie, A. G., & Unterholzner, L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 911-922.
- Breiner, K. M., Schaller, H., & Knolle, P. A. (2001). Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepatology*, 34(4 Pt 1), 803-808.
- Carbone, F. R., & Bevan, M. J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med*, 171(2), 377-387.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), 3666-3670.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. [Review]. *Science*, 296(5573), 1634-1635.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81(4), 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., et al. (1996). FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 271(9), 4961-4965.
- Choi, J., & Ou, J. H. (2006). Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(5), G847-851.
- Cook, S. A., Sugden, P. H., & Clerk, A. (1999). Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res*, 85(10), 940-949.
- Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67(4), 2168-2174.
- Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I., & Schulze-Osthoff, K. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 15(7), 1022-1032.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., & Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*, 192(12), 1685-1696.

- Deveraux, Q. L., & Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13(3), 239-252.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., et al. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, 17(8), 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(6639), 300-304.
- Diehl, L., Schurich, A., Grochtmann, R., Hegenbarth, S., Chen, L., & Knolle, P. A. (2008). Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology*, 47(1), 296-305.
- Ding, W. X., & Yin, X. M. (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med*, 8(4), 445-454.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A., & Cartier, J. (2008). IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*, 7(8), 1036-1046.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11(13), 1050-1062.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- Eckelman, B. P., & Salvesen, G. S. (2006). The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem*, 281(6), 3254-3260.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., & Scott, F. L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 7(10), 988-994.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M., et al. (1999). Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *Journal of immunology*, 163(12), 6762-6768.
- Fong, W. G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., & Korneluk, R. G. (2000). Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, 70(1), 113-122.
- Gabrilovich, D. I., Patterson, S., Harvey, J. J., Woods, G. M., Elsley, W., & Knight, S. C. (1994). Murine retrovirus induces defects in the function of dendritic cells at early stages of infection. *Cell Immunol*, 158(1), 167-181.
- Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., et al. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression

- of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, 230(2), 217-227.
- Galea, I., Bernardes-Silva, M., Forse, P. A., van Rooijen, N., Liblau, R. S., & Perry, V. H. (2007). An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), 2023-2030.
- Gao, B., Radaeva, S., & Park, O. (2009). Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of leukocyte biology*, 86(3), 513-528.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., et al. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4498-4503.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21(3), 311-335.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1), 59-74.
- Grell, M. (1995). Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *Journal of inflammation*, 47(1-2), 8-17.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2004). Cheating death in the liver. *Nat Med*, 10(6), 587-588.
- Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*, 19, 65-91.
- Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R., & Chisari, F. V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 4(1), 25-36.
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W., et al. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol*, 10(11), 1309-1317.
- Hegenbarth, S., Gerolami, R., Protzer, U., Tran, P. L., Brechot, C., Gerken, G., et al. (2000). Liver sinusoidal endothelial cells are not permissive for adenovirus type 5. *Hum Gene Ther*, 11(3), 481-486.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Henkart, P. A. (1997). CTL effector functions. *Semin Immunol*, 9(2), 85-86.
- Heymann, F., Meyer-Schwesinger, C., Hamilton-Williams, E. E., Hammerich, L., Panzer, U., Kaden, S., et al. (2009). Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1286-1297.
- Holtappels, R., Podlech, J., Pahl-Seibert, M. F., Julch, M., Thomas, D., Simon, C. O., et al.

- (2004). Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *The Journal of experimental medicine*, 199(1), 131-136.
- Holz, L. E., Benseler, V., Bowen, D. G., Bouillet, P., Strasser, A., O'Reilly, L., et al. (2008). Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology*, 135(3), 989-997.
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81(4), 495-504.
- Iannacone, M., Sitia, G., Isogawa, M., Marchese, P., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., et al. (2005). Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nature Medicine*, 11(11), 1167-1169.
- Jacob, A. I., Goldberg, P. K., Bloom, N., Degenshein, G. A., & Kozinn, P. J. (1977). Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*, 72(6), 1268-1270.
- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Kanta, J., Dooley, S., Delvoux, B., Breuer, S., D'Amico, T., & Gressner, A. M. (2002). Tropoelastin expression is up-regulated during activation of hepatic stellate cells and in the livers of CCl(4)-cirrhotic rats. *Liver*, 22(3), 220-227.
- Kashkar, H. (2010). X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise. *Clin Cancer Res*, 16(18), 4496-4502.
- Katz, S. C., Pillarisetty, V. G., Bleier, J. I., Kingham, T. P., Chaudhry, U. I., Shah, A. B., et al. (2005). Conventional liver CD4 T cells are functionally distinct and suppressed by environmental factors. *Hepatology*, 42(2), 293-300.
- Kern, M., Popov, A., Kurts, C., Schultze, J. L., & Knolle, P. A. (2010). Taking off the brakes: T cell immunity in the liver. *Trends in Immunology*, 31(8), 311-317.
- Kern, M., Popov, A., Scholz, K., Schumak, B., Djandji, D., Limmer, A., et al. (2010). Virally infected mouse liver endothelial cells trigger CD8+ T-cell immunity. *Gastroenterology*, 138(1), 336-346.
- Kim, Y. S., Morgan, M. J., Choksi, S., & Liu, Z. G. (2007). TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Molecular cell*, 26(5), 675-687.
- Klein, I., Cornejo, J. C., Polakos, N. K., John, B., Wuensch, S. A., Topham, D. J., et al. (2007). Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*, 110(12), 4077-4085.
- Knolle, P., Schlaak, J., Uhrig, A., Kempf, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., & Gerken, G. (1995). Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol*, 22(2), 226-229.

- Knolle, P. A., & Gerken, G. (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 174, 21-34.
- Knolle, P. A., & Limmer, A. (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly*, 133(37-38), 501-506.
- Knolle, P. A., Schmitt, E., Jin, S., Germann, T., Duchmann, R., Hegenbarth, S., et al. (1999). Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology*, 116(6), 1428-1440.
- Knolle, P. A., Uhrig, A., Hegenbarth, S., Loser, E., Schmitt, E., Gerken, G., et al. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and experimental immunology*, 114(3), 427-433.
- Kominsky, D. J., Bickel, R. J., & Tyler, K. L. (2002). Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. *Journal of virology*, 76(22), 11414-11424.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., & Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 7(12), 1166-1173.
- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., & Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 184(3), 923-930.
- Kurts, C., Robinson, B. W., & Knolle, P. A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 403-414.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneider, R., et al. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111(3), 331-342.
- Lacasse, E. C., Kandimalla, E. R., Winocour, P., Sullivan, T., Agrawal, S., Gillard, J. W., et al. (2005). Application of XIAP antisense to cancer and other proliferative disorders: development of AEG35156/ GEM640. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1058, 215-234.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252-6275.
- Lang, K. S., Georgiev, P., Recher, M., Navarini, A. A., Bergthaler, A., Heikenwalder, M., et al. (2006). Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *The Journal of clinical investigation*, 116(9), 2456-2463.
- Lang, P. A., Contaldo, C., Georgiev, P., El-Badry, A. M., Recher, M., Kurrer, M., et al. (2008).

- Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. *Nature medicine*, 14(7), 756-761.
- Li, H. L., Chen, D. D., Li, X. H., Zhang, H. W., Lu, Y. Q., Ye, C. L., et al. (2002). Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World journal of gastroenterology : WJG*, 8(3), 431-435.
- Li, L., Thomas, R. M., Suzuki, H., De Brabander, J. K., Wang, X., & Harran, P. G. (2004). A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF α -mediated cell death. *Science*, 305(5689), 1471-1474.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., et al. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
- Li, Q., Kay, M. A., Finegold, M., Stratford-Perricaudet, L. D., & Woo, S. L. (1993). Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther*, 4(4), 403-409.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., et al. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8 $^{+}$ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*, 6(12), 1348-1354.
- Limmer, A., Ohl, J., Wingender, G., Berg, M., Jüngerkes, F., Schumak, B., et al. (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *European Journal of Immunology*, 35(10), 2970-2981.
- Liston, P., Fong, W. G., & Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, 22(53), 8568-8580.
- Liu, S., Gallo, D. J., Green, A. M., Williams, D. L., Gong, X., Shapiro, R. A., et al. (2002). Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF- κ B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 70(7), 3433-3442.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Betz, S. F., Oost, T., et al. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*, 408(6815), 1004-1008.
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Lu, X., Lee, M., Tran, T., & Block, T. (2005). High level expression of apoptosis inhibitor in hepatoma cell line expressing Hepatitis B virus. *Int J Med Sci*, 2(1), 30-35.
- Maini, M. K., Boni, C., Lee, C. K., Larrubia, J. R., Reignat, S., Ogg, G. S., et al. (2000). The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*, 191(8), 1269-1280.

- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 244(22), 6056-6063.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., et al. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 16(10), 2794-2804.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2), 135-145.
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181-190.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 958-969.
- Nagata, S. (1996). Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol*, 406, 119-124.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. [Review]. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), 173-182.
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22(8), 299-306.
- Nishimura, M., & Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*, 28(5), 886-892.
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 20(2), 87-103.
- Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature*, 396(6707), 119-122.
- Ratner, A., & Clark, W. R. (1993). Role of TNF- α in CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *Journal of immunology*, 150(10), 4303-4314.
- Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., & Haussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280(29), 27179-27194.
- Salio, M., Cella, M., Suter, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol*, 29(10), 3245-3253.
- Salvesen, G. S., & Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. [Review]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 10964-10967.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14(4), 778-809, table of contents.
- Savinov, A. Y., Wong, F. S., Stonebraker, A. C., & Chervonsky, A. V. (2003). Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 197(5), 643-656.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., et al. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17(6), 1675-1687.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254(3), 439-459.
- Schurich, A., Bottcher, J. P., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., et al. (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology*, 50(3), 909-919.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., & Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature*, 398(6722), 77-80.
- Smedsrod, B. (2004). Clearance function of scavenger endothelial cells. *Comp Hepatol*, 3 Suppl 1, S22.
- Stephoe, R. J., Patel, R. K., Subbotin, V. M., & Thomson, A. W. (2000). Comparative analysis of dendritic cell density and total number in commonly transplanted organs: morphometric estimation in normal mice. *Transpl Immunol*, 8(1), 49-56.
- Stratford-Perricaudet, L. D., Levrero, M., Chasse, J. F., Perricaudet, M., & Briand, P. (1990). Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 1(3), 241-256.
- Sumpter, T. L., Abe, M., Tokita, D., & Thomson, A. W. (2007). Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology*, 46(6), 2021-2031.
- Tamm, I., Kornblau, S. M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., et al. (2000). Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), 1796-1803.
- Tang, P., Hung, M. C., & Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35(25), 8216-8225.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., & Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74(5), 845-853.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, 285(5424), 107-110.
- Thommesen, L., & Laegreid, A. (2005). Distinct differences between TNF receptor 1- and TNF receptor 2-mediated activation of NFkappaB. *J Biochem Mol Biol*, 38(3), 281-289.
- Thorburn, J., Bender, L. M., Morgan, M. J., & Thorburn, A. (2003). Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 14(1), 67-77.
- Tilg, H., & Diehl, A. M. (2000). Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl*

- J Med*, 343(20), 1467-1476.
- Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 735-747.
- Tsukamoto, H., & Lu, S. C. (2001). Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J*, 15(8), 1335-1349.
- Twu, J. S., Lee, C. H., Lin, P. M., & Schloemer, R. H. (1988). Hepatitis B virus suppresses expression of human beta-interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), 252-256.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., et al. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43-53.
- von Oppen, N., Schurich, A., Hegenbarth, S., Stabenow, D., Tolba, R., Weiskirchen, R., et al. (2009). Systemic antigen cross-presented by liver sinusoidal endothelial cells induces liver-specific CD8 T-cell retention and tolerization. *Hepatology*, 49(5), 1664-1672.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1), 45-65.
- Wang, X., Viswanath, R., Zhao, J., Tang, S., & Hewlett, I. (2010). Changes in the level of apoptosis-related proteins in Jurkat cells infected with HIV-1 versus HIV-2. *Molecular and cellular biochemistry*, 337(1-2), 175-183.
- Warren, A., Le Couteur, D. G., Fraser, R., Bowen, D. G., McCaughan, G. W., & Bertolino, P. (2006). T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 44(5), 1182-1190.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H., & Chisari, F. V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6669-6674.
- Wilson, N. S., Dixit, V., & Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology*, 10(4), 348-355.
- Winau, F., Hegasy, G., Weiskirchen, R., Weber, S., Cassan, C., Sieling, P. A., et al. (2007). Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. *Immunity*, 26(1), 117-129.
- Wu, K. K. (1996). Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *Journal of internal medicine*, 239(1), 17-34.
- Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., et al. (2009). Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature*, 460(7259), 1159-1163.
- Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (1999). Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. [Review]. *Annual review of cell and*

developmental biology, 15, 579-606.

Yin, X. M., & Ding, W. X. (2003). Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med*, 3(6), 491-508.

Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92(1), 57-70.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274(17), 11549-11556.

VII. Abbildungsverzeichnis

I. Einleitung

Abb. I.1 Die Zellpopulationen der Leber	2
Abb. I.2 TNFR1-vermittelter Apoptose-Signalweg (Duprez et al., 2009)	10
Abb. I.3 Hemmung der Caspasen-3 und -9 durch XIAP (Cheung et al., 2006)	13

III. Material und Methoden

Abb. III.1 Dichte-Gradient für die Kupffer Zell Aufreinigung	28
Abb. III.2 Virustitration in einer 12-Loch Platte.....	36

IV. Ergebnisse

Abb. IV.1 Charakterisierung transgener Mäuse.....	40
Abb. IV.2 Aktivierte OT-I T Zellen führen zu einer Hepatitis in AdOVA infizierten Mäusen	41
Abb. IV.3 Adenovirus infiziert nur Hepatozyten und keine LSEC	42
Abb. IV.4 LSEC kreuzpräsentieren virales Antigen von Hepatozyten	44
Abb. IV.5 Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Hepatitis.....	46
Abb. IV.6 Makrophagen spielen keine Rolle für die Hepatitisinduktion.....	47
Abb. IV.7 Kreuzpräsentation von LSEC führt zur Viruselimination	49
Abb. IV.8 Endothelschaden ist nicht für virale Hepatitis verantwortlich	50
Abb. IV.9 TNF von zytotoxischen T Zellen führt zur Hepatitis	53
Abb. IV.10 Die virale Infektion sensibilisiert die Hepatozyten für den TNF-vermittelten Zelltod	55
Abb. IV.11 Die Hepatitis hängt direkt mit der Anzahl infizierter Hepatozyten zusammen.....	57
Abb. IV.12 TNF vermittelter Zelltod ist hepatozytenspezifisch.....	58
Abb. IV.13 Apoptoseinduktion infizierter Hepatozyten.....	60
Abb. IV.14 ROS-Inhibition reduziert die TNF-vermittelte virale Hepatitis.....	61
Abb. IV.15 XIAP hemmt die Apoptose in nicht infizierten Hepatozyten	63

V. Diskussion

Abb. V.1 Zusammenfassendes Schaubild der TNF-vermittelten viralen Hepatitis	73
---	----

VIII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Apaf-1	<i>engl.</i> apoptotic protease activating factor 1
APC	Antigen-Präsentierende Zelle (<i>engl.</i> antigen presenting cell), Allophycocyanin
Bak	<i>engl.</i> Bcl-2 antagonistic killer
Bax	<i>engl.</i> Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	<i>engl.</i> B-cell lymphoma 2
Bid	<i>engl.</i> BH3-interacting domain death agonist
bidest.	bidestilliert
BIR	<i>engl.</i> Baculovirus IAP Repeat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl.</i> bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Zelloberflächenmarker (<i>engl.</i> cluster of differentiation)
clAP	<i>engl.</i> cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CTL	<i>engl.</i> cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritische Zelle (<i>engl.</i> dendritic cell)
DED	<i>engl.</i> death effector domain
DD	<i>engl.</i> death domain
DIABLO	<i>engl.</i> direct IAP binding protein with low Pi
DISC	<i>engl.</i> death inducing signaling complex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay
FADD	<i>engl.</i> Fas associated death domain
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötales Kälberserum (<i>engl.</i> fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
g	Gramm, Erdbeschleunigung ($9,81\text{m/s}^2$)
GBSS	<i>engl.</i> Gey's balanced salt solution
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> green fluorescent protein)

HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
IAP	<i>engl.</i> inhibitor of apoptosis protein
IBM	<i>engl.</i> IAP binding motif
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
l	Liter
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	<i>engl.</i> liver sinusoidal endothelial cells
M	Molar
m	milli
	Meter
μ	mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>engl.</i> magnetic activated cell sorter)
Mcl-1	<i>engl.</i> myeloid leukemia factor-1
MCMV	murines Cytomegalovirus
Min.	Minute
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
n	nano
NK	Natürliche Killer-
OVA	Ovalbumin
p	piko
Pam ₃ Cys	N-Palmitoyl-(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl ₃ -lysine x 3HCl
PAMP	<i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
polyIC	<i>engl.</i> poly-inosinic acid-cytidylic acid
PRR	<i>engl.</i> pattern-recognition receptors
RIP1	<i>engl.</i> receptor interacting protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>engl.</i> reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde

SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
Smac	<i>engl.</i> second mitochondria derived activator of caspases
SPF	<i>engl.</i> specific pathogen free
SSC	<i>engl.</i> sideward scatter
Std.	Stunde
TLR	<i>engl.</i> toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	<i>engl.</i> TNF-receptor associated DD
TRAF2	<i>engl.</i> TNFR-associated factor 2
U	Unit(s), Einheit von Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen (<i>engl.</i> volume to volume)
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen (<i>engl.</i> weight to volume)
WT	wildtyp
XIAP	<i>engl.</i> x-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel